T H E S E S

Présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

René DEMPURE

Licencié ès Sciences

Ingénieur E.S.B.M.B.A.

* * *

Première thèse

ETUDE DU METABOLISME DE L'ACETALDEHYDE

CHEZ SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS

Deuxième thèse

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

* * *

Soutenues le 7 décembre 1968 devant la commission d'Examen

MM.	R. GAY	Président
	C.A. MASSCHELEIN	Examinateur
	C. ALAIS	"
	M. METCHE	"

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555023_0018

T H E S E S

Présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

René DEMPURE

Licencié ès Sciences

Ingénieur E.S.B.M.B.A.

* * *

Première thèse

ETUDE DU METABOLISME DE L'ACETALDEHYDE

CHEZ SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS

Deuxième thèse

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

* * *

Soutenues le 7 décembre 1968 devant la commission d'Examen

MM.	R. GAY	Président
	C.A. MASSCHELEIN	Examinateur
	C. ALAIS	"
	M. METCHE	"

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

VERSITE DE NANCY — Faculté des Sciences

Doyen : M. AUBRY

Assesseur : M. GAY

ens Honoraires : MM. CORNUBERT - DELSARTE - ROUBAULT

ofesseurs honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE - EICHHORN - DEMENT - DUBREUIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - DE MALLEMANN - LONCHAMBON - LETORT - DE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT - CHAPELLE - GUERIN - WAHL.

tres de conférences honoraires : MM. LIEHNART - PIERRET

Professeurs

DELSARTE	Analyse supérieure	HADNI	Physique
ROUBAULT	Géologie	*BASTICK	Chimie
CAPELLE	Mécanique ration.	DUCHAUFOUR	Pédologie
VEILLET	Biologie animale	GARNIER	Agronomie
BARRIOL	Chimie théorique	NEEL	Chimie Org. Industrielle
BIZETTE	Physique	BERNARD	Géologie appliquée
GUILLIEN	Electronique	* CHAMPIER	Physique
LEGRAS	Mécanique ration.	* GAY	Chimie biol.
BOLFA	Minéral. et crist.	STEPHAN	Zoologie
NICLAUSE	Chimie	* CONDE	Zoologie
FAIVRE	Physique appliquée	* WERNER	Botanique
AUBRY	Chimie minérale	EYMARD	Calcul différentiel int.
COPPENS	Radiogéologie	LEVISALLES	Chimie organique
DUVAL	Chimie	Mme HERVE	Mét. Math. de la physique
FRUHLING	Physique	* GOSSE	Mécanique physique
HILLY	Géologie	FELDEN	Physique
LE GOFF	Génie chimique	* DAVOINE	Physique (ENSEM)
SUHNER	Physique expérim.	HORN	Physique (1er cycle)
CHAPON	Chimie biologique	* ROCCI	Géologie
HEROLD	Chimie minér. Indus.	Mme LUMER	Mathématiques
SCHWARTZ B.	Exploitation minière	N ...	Chimie biologique
* MALAPRADE	Chimie	N ...	Mécanique appliquée
MANGENOT	Botanique	N ...	Chimie physique
GAYET	Physiologie		

* Professeur titulaire à titre personnel

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	BASTICK	Chimie M.P.C. (Epinal)
MM.	GUDEFIN	Physique
	VUILLAUME	Psychophysiologie
	FRENTZ	Biologie animale
	MARI	Chimie (I.S.I.N.)
	AUROUZE	Géologie
	DEVIOT	Physique du solide
	FLECHON	Physique M.P.C.
Mlle	HUET	Mathématiques S.P.C.N. (en disponibilité)
	VIGNES	Métallurgie
	BALESDENT	Thermodynamique chimique appliquée
	BLAZY	Minéralogie appliquée (ENSG)
	JANOT	Physique M.P.C. (Epinal)
	JACQUIN	Pédologie et chimie agricole
	MAINARD	Physique M.G.P.
	CACHAN	Entomologie appliquée (ENSA)
	MARTIN	Chimie M.P.C.
	PAULMIER	Mécanique expérimentale
	PROTAS	Minéralogie
	JOZEFOWICZ	Physico-chimie
	JURAIN	Géologie (S.P.C.N.)
	RIVAIL	Chimie appliquée (CUCES)
	VILLERMAUX	Génie chimique
	METCHE	Biochimie appliquée (Ecole de Brasserie)
	PAIR	Mathématiques appliquées
	BAUMANN	Physique 1er cycle
	DURAND	Physique
	GRANGE	Physique (I.S.I.N.)
	DEPAIX	Probabilité & Statistiques
	N...	Mécanique des fluides (I.S.I.N.)
	N...	Mécanique (I.S.I.N.)
	N...	Mathématiques
	N...	Mathématiques P.C.
	N...	Mathématiques C.B.G.
	N...	Physiologie animale
	N...	Mathématiques M.P.

A mes Parents

A ma Femme

A mon Fils

A V A N T - P R O P O S

Ce travail entrepris avec Monsieur le Doyen URION† a été réalisé à l'Ecole Supérieure de Brasserie-Malterie et Biochimie Appliquée sous la direction de Monsieur le Professeur GAY que nous remercions trés vivement pour la bienveillance avec laquelle il nous a guidé.

Nous sommes particulièrement reconnaissant à Monsieur MASSCHELEIN, Professeur au C.E.R.I.A. (BRUXELLES) pour l'aide et les très nombreux conseils qu'il nous a prodigués.

Nous remercions également Monsieur CHOLLOT, Monsieur BOURGEOIS et Monsieur PETITDEMANGE pour leur collaboration et leur amitié.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur ALAIS et Monsieur METCHE, Maitres de Conférence qui ont bien voulu faire partie du jury.

Nous tenons enfin à exprimer notre vive gratitude envers Monsieur DEYMIE, Directeur du Centre Technique de la Brasserie et Malterie Françaises qui nous a permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

BUT DU PRESENT TRAVAIL

Ce travail s'est limité à l'étude du métabolisme carboné des levures de brasserie, genre Saccharomyces. Le but principal au départ était d'établir une différenciation entre les diverses levures de brasserie à savoir S. carlsbergensis et S. cerevisiae, sur la base de l'analyse des composés volatils.

Il nous a été possible de mettre en évidence une accumulation d'acétaldéhyde lors de la croissance de S. carlsbergensis, accumulation qui était inexistante pour S. cerevisiae. Notons cependant que ces essais ne sont limités à des cas bien particuliers qui ne nous permettent pas de généraliser le phénomène.

Les travaux de MASSCHELEIN et coll. (1960) ont mis en évidence chez S. carlsbergensis un contre effet PASTEUR marqué impliquant un phénomène de diauxie. Au cours de la première phase, le glucose est fermenté. Dans la deuxième l'éthanol accumulé est métabolisé de façon oxydative ce qui suggère la présence d'une alcool deshydrogénase II (SCHIMPFESSEL 1964).

Ce phénomène d'accumulation d'acétaldéhyde chez S. carlsbergensis a été mis en parallèle avec S. cerevisiae. Afin d'élucider cette différence métabolique, nous avons étudié successivement :

1) - Les courbes de croissance de S. carlsbergensis et de S. cerevisiae ainsi que la production d'acétaldéhyde.

2) - L'évolution du QO_2 et l'assimilation du glucose chez S. carlsbergensis.

3) - L'évolution de l'activité des alcools deshydrogénases (NAD^+ oxydoréductases) au cours de la croissance de S. carlsbergensis.

4) - Les thermostabilités des alcools deshydrogénases après fermentation du glucose et après oxydation de l'éthanol accumulé chez S. carlsbergensis.

PARTIE THEORIQUE

La connaissance du métabolisme et sa régulation chez les levures pourront apporter une aide précieuse dans le contrôle industriel, en brasserie notamment. Ces études permettent de mieux comprendre le phénomène "fermentation" et par là son orientation dans une direction bien déterminée. Les multiples possibilités qu'ont les levures à s'adapter aux différents substrats carbonés ont été étudiées par WICKERHAM et BURTON (1948) et ont permis une classification nouvelle.

Par la suite LODDER et KREGER-VAN-REJ N.J.W. (1952) ont pu recueillir les différentes caractéristiques biochimiques d'un grand nombre de levures. Citons à titre d'exemple le cas de Saccharomyces carlsbergensis, levure basse de brasserie qui fermente entièrement le raffinose alors que Saccharomyces cerevisiae, levure haute, n'en fermente qu'un tiers. Les levures sont capables également d'assimiler un certain nombre d'hydrates de carbone bien définis. En fonction de la nature du substrat et selon l'absence ou la présence d'oxygène, il y aura deux processus : une fermentation en absence d'air selon un processus purement anaérobie ou une assimilation avec consommation d'oxygène selon un processus aérobie.

A) VOIES METABOLIQUES DE DEGRADATION DES HEXOSES

Quelque soit le processus envisagé, la cellule catabolise les hydrates de carbone afin de produire de l'énergie (ATP) et des métabolites nécessaires aux différentes biosynthèses.

Les principales voies de dégradation sont au nombre de trois : celle de EMBDEN, MEYERHOF et PARNAS (E.M.P.), celle des pentoses phosphates ou de WARBURG-DICKENS (W.D.) et le cycle des acides tricarboxyliques (C.T.C.) ou cycle de KREBS. Une voie annexe existe chez les micro organismes se développant sur C_2 (acétate ou éthanol) , le "shunt glyoxylique".

La voie EMP est une voie purement anaérobie et pour la levure elle aboutit, à partir du glucose, à la formation d'alcool éthylique et de CO_2. En absence d'oxygène c'est le seul chemin de dégradation des hydrates de carbone, et les enzymes d'oxydoréduction fonctionnent avec le coenzyme NAD^+.

Dans la voie des pentoses phosphates et pour la levure en général, le coenzyme intervenant est le $NADP^+$ et l'oxydo-réduction est couplée avec une NADPH cytochrome c réductase selon le schéma suivant :

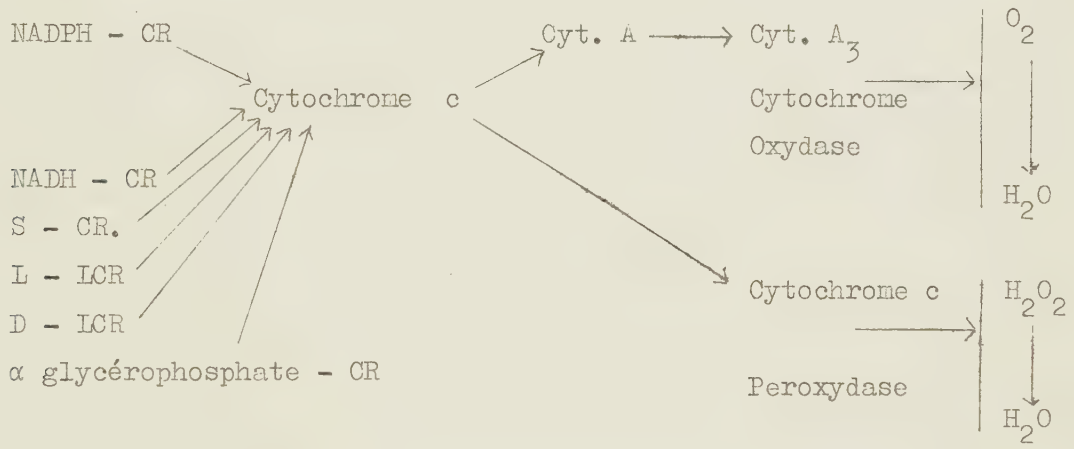
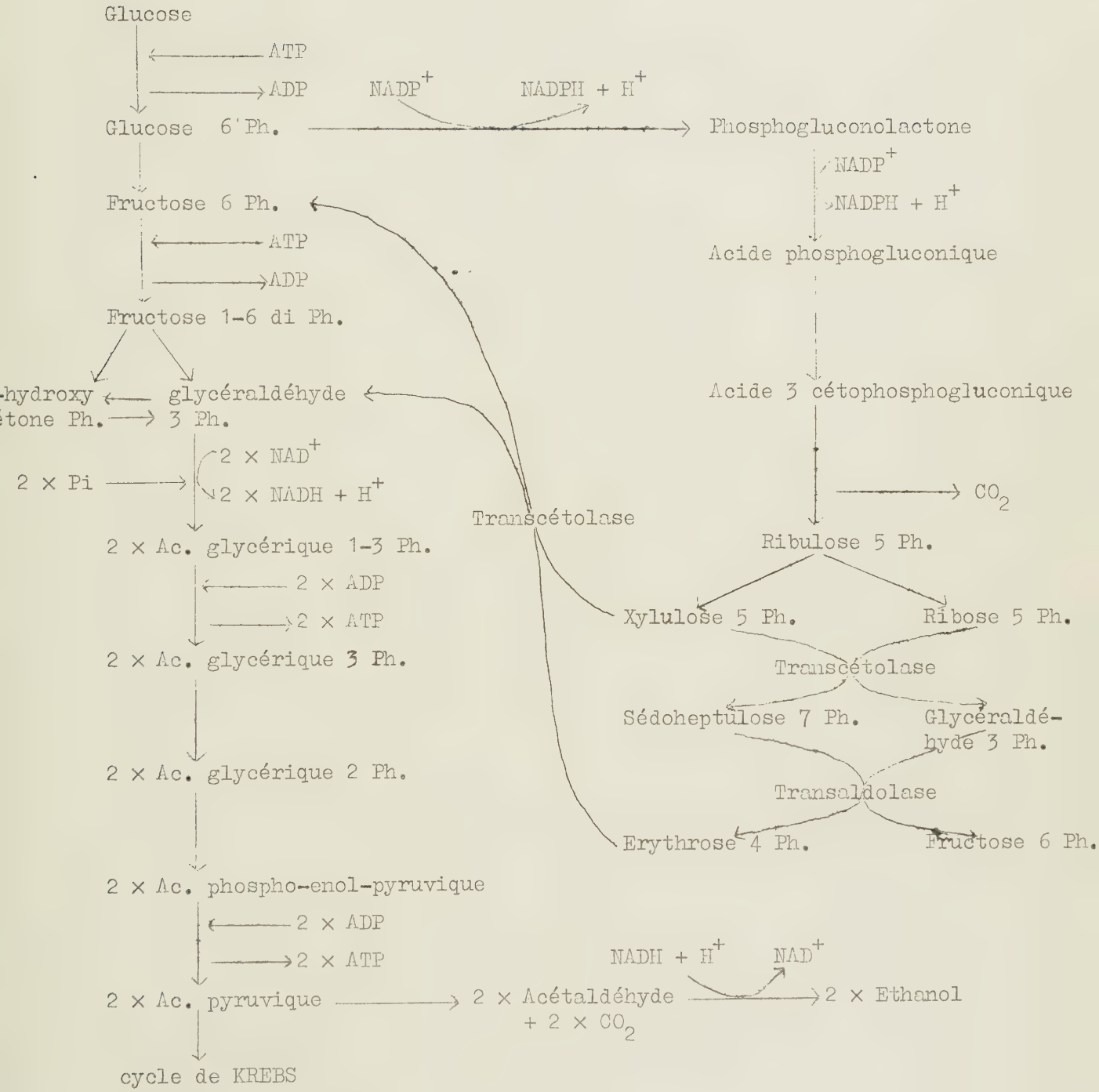


Schéma de la respiration terminale de la levure (GALZY 1967)

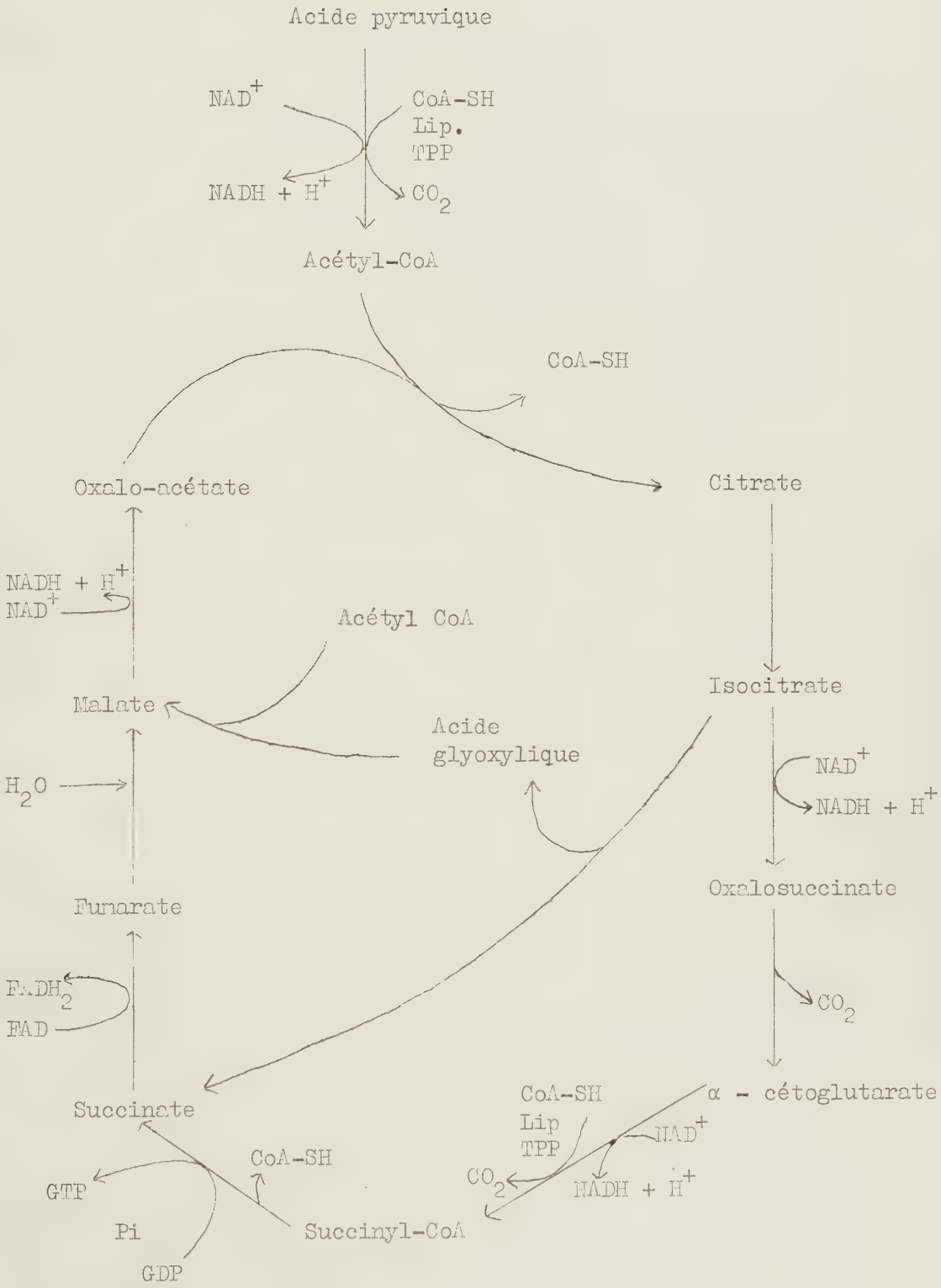
Il y a donc dans la voie W.D. un processus oxydatif qui aboutit au même produit que la voie anaérobie : le triose phosphate. Le passage à l'acide pyruvique est ensuite commun pour les deux voies.

C'est au niveau du pyruvate que la deuxième voie vient se greffer. Son existence chez la levure fut mise en évidence par KORNER (1951), KRAMPITZ (1954) OCHOA (1958) VANDERWINKEL et coll. (1958). L'oxydation par la chaine respiratoire couplée au C.T.C. fournit du CO_2 et H_2O par l'intermédiaire des deshydrogénases liées au NAD^+ au $NADP^+$ ou aux coenzymes flaviniques. Le transfert des électrons se poursuit alors à travers la chaine des enzymes respiratoires. La synthèse d'A.T.P. y est très importante.

En conclusion deux voies conduisent à l'acide pyruvique : l'EMP et le cycle des pentoses phosphates. En aérobiose, il y a dégradation du pyruvate en CO_2 et H_2O par le C.T.C. et en anaérobiose production d'éthanol et de CO_2 en passant par l'acétaldéhyde comme intermédiaire. L'ensemble de ces données est résumé par les schémas des deux pages suivantes.



Voies E.M.P. et W.D.



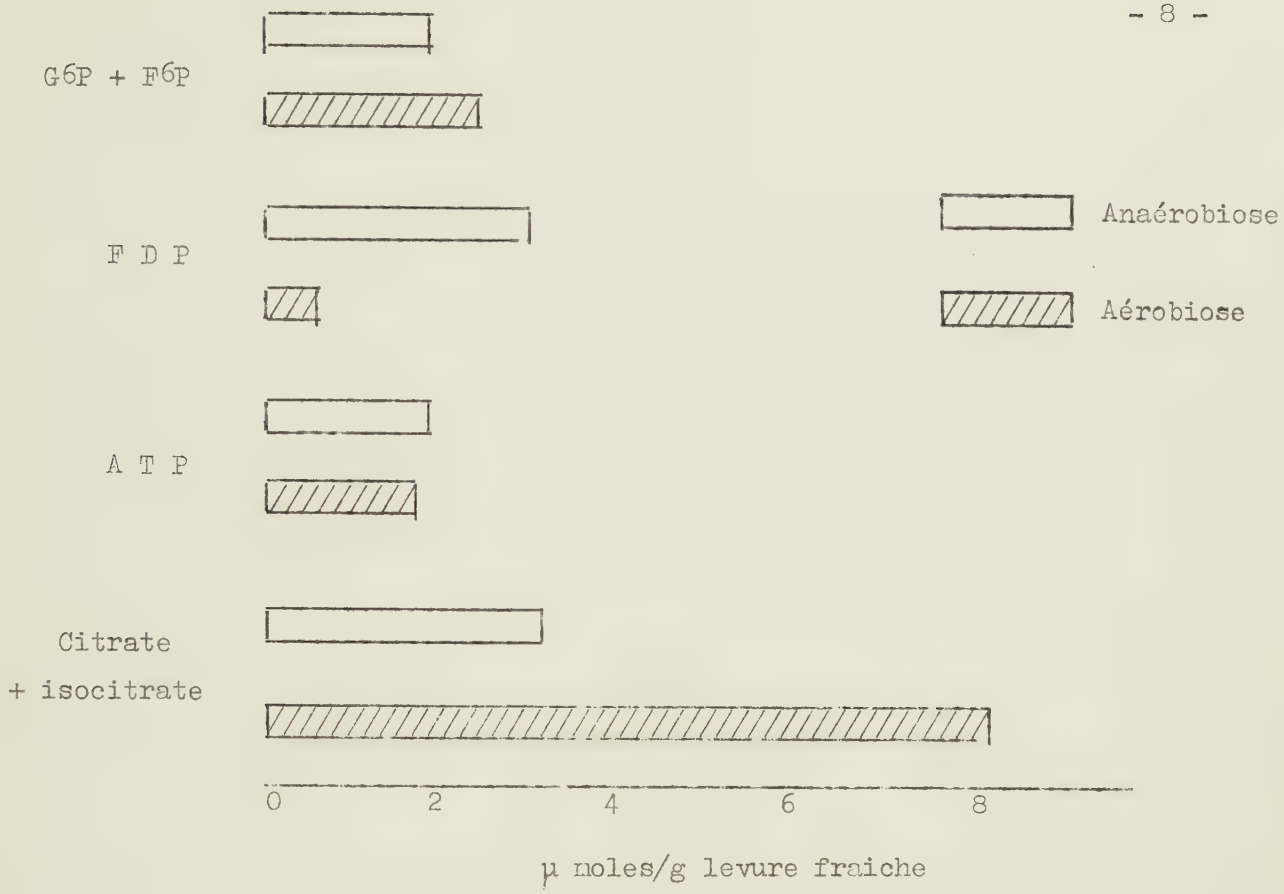
Cycle de KREBS (CTC) et cycle glyoxylique

B) REGULATION DES VOIES D'ASSIMILATION DES HEXOSES

Les besoins cellulaires en métabolites intermédiaires ainsi qu'en A.T.P. et NADPH sont trés variables au cours de la croissance d'un microorganisme. Leur production est fonction de ces besoins et il s'établit un équilibre entre l'offre et la demande. La vitesse de production de ces substances est donc variable ce qui laisse supposer que les séquences métaboliques qui leur donnent naissance sont soumises à une régulation. Ces phénomènes de régulation étudiés depuis très longtemps sont encore l'objet de très nombreuses recherches et mises au point.

Dès 1876 PASTEUR constatait qu'en présence d'oxygène la levure consommait le sucre plus lentement qu'en anaérobiose, mais de façon plus efficace de telle sorte que le rapport poids de levure formé sur poids de sucre consommé était plus important en aérobiose. Ce qui signifie qu'il y a une inhibition de la fermentation ou comme l'a défini VAN EYS (1961) il y a maintien de la glycolyse dans un état de régime bas par l'utilisation de l'oxygène. De très nombreuses théories ont tenté d'expliquer cette régulation du métabolisme entre la voie aérobie (CTC) et la voie anaérobie (EMP).

Des travaux récents (SOLS 1967) confirment pour S. cerevisiae et en aérobiose, une inhibition de la glycolyse pour des cellules au repos. Cette faible utilisation du glucose par rapport aux conditions d'anaérobiose se manifeste par un désiquilibre entre la concentration des hexoses monophosphate et celle des hexoses diphosphate (F.D.P.). Les taux de ces hexoses-phosphates, de l'A.T.P. et des citrate-isocitrate établis parallèlement en aérobiose et anaérobiose donnent les résultats suivants (SOLS A. 1967 - GAY 1968).



On constate une accumulation des citrate-isocitrate et une utilisation du F.D.P. en aérobiose. L'A.T.P. varie peu. Les différents niveaux où la fermentation est bloquée sont les suivants :

1) Transport :

Puisque peu de glucose est consommé et qu'il n'y a pas d'accumulation de glucose libre dans la cellule, mais une accumulation des hexoses 6 phosphate on peut concevoir une inhibition du transport du glucose et on l'a démontrée. Un composé issu du métabolisme du glucose inhibe le système de transport. L'hypothèse actuelle est que la rétroinhibition est due au G 6 P

2) La phosphofructokinase :

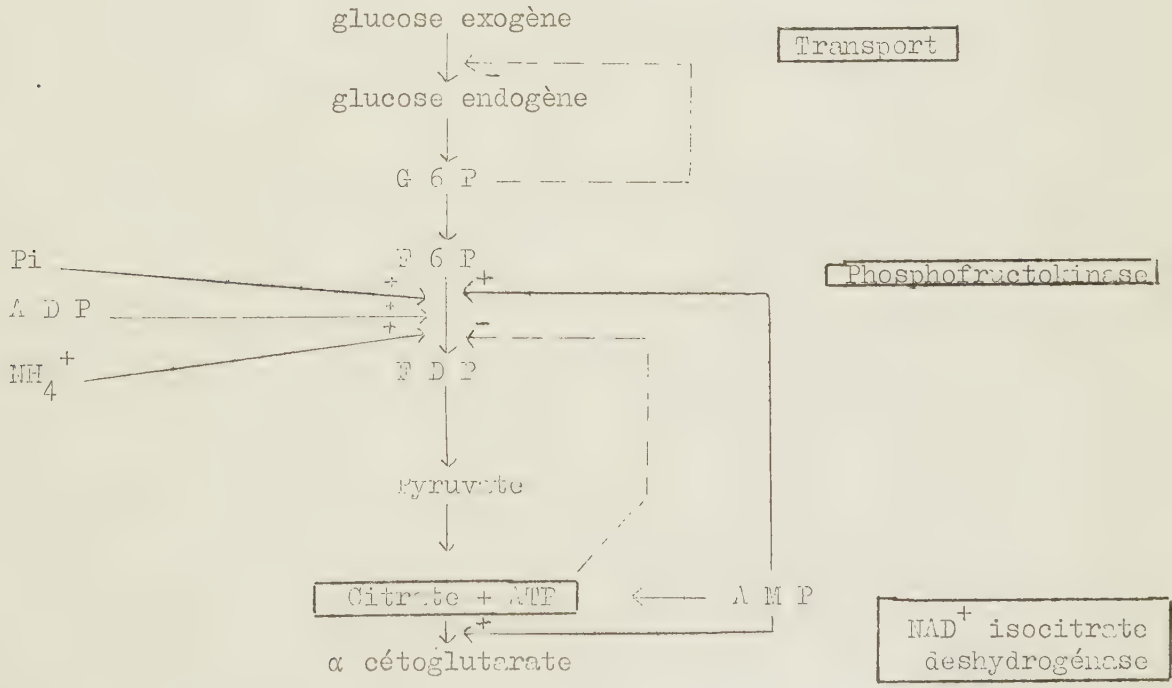
L'inhibition de cet enzyme est suggérée par le faible taux de F.D.P. Les expériences "in vitro" ont montré que la phosphofructokinase, enzyme allostérique, était inhibée par l'A.T.P. et le citrate.

L'A.M.P. par contre, le Pi et l'A.D.P. sont des activateurs allostériques de cet enzyme.

3) L'isocitrate deshydrogénase liée au NAD^+

Il y a équilibre entre citrate et isocitrate avec une constante d'équilibre très en faveur du citrate. Comme il y a accumulation de citrate, on conçoit que cet enzyme joue un rôle dans l'effet PASTEUR. L'isocitrate deshydrogénase à NAD^+ est allostérique et l'A.M.P. est un activateur puissant. Sans ou avec très peu d'A.M.P. l'enzyme a peu d'affinité pour l'isocitrate. En aérobiose, il y a justement peu d'A.M.P. ce qui entraine une accumulation de citrate.

On peut résumer ces données par le schéma suivant :



En conclusion, l'effet PASTEUR joue sur l'activité propre d'un enzyme et non pas sur la synthèse protéique de cet enzyme. Il se manifeste en absence de multiplication cellulaire.

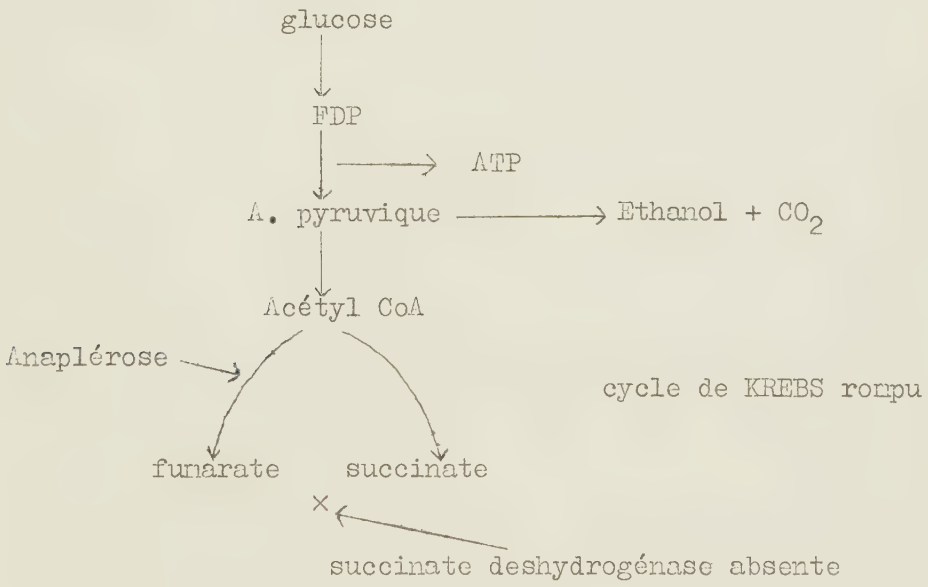
Le phénomène opposé ou effet PASTEUR négatif c'est-à-dire l'inhibition de la fermentation dans des conditions anaérobies ou sa stimulation en présence d'oxygène a été découvert dans des cas expérimentaux particuliers chez le genre Saccharomyces et Brettanomyces par WIKEN et RICHARD (1953) et rapporté par WIKEN (1967). On peut le résumer ainsi :

- avec des cellules entières ou un extrait acellulaire de Saccharomyces dans un tampon succinate-acide succinique, il y a intervention de l'acide succinique au niveau de l'hexokinase par manque d'A.T.P. La pénétration de l'acide succinique est commandée par l'oxygène. Si la tension de ce dernier diminue, l'accès de l'acide succinique à l'hexokinase est favorisé, et la fermentation est bloquée. La diminution du pH ou l'augmentation de la concentration du tampon ont les mêmes effets.

- avec des cellules entières de Brettanomyces ou des extraits acellulaires de Saccharomyces, mais sans tampon succinate-acide succinique, l'effet PASTEUR négatif s'explique par un manque de NAD^+ au niveau de la phosphoglycéraldéhyde deshydrogénase. L'oxygène permet dans ce cas l'oxydation du NADH en NAD^+ et l'activité de la deshydrogénase réapparait. Des produits carbonylés comme l'acétaldéhyde ont les mêmes effets.

SWANSON et CLIFTON (1948) ont cependant montré qu'en aérobiose et lors de la croissance, l'énergie nécessaire aux synthèses était issue en premier lieu de la fermentation puis en second lieu de la respiration de l'éthanol accumulé. Cette observation paradoxale ne fut expliquée qu'en 1956 par SLONIMSKY sous le terme de contre effet PASTEUR. Il constate en effet que le QO_2 passe par un minimum lors de la phase exponentielle et ceci en raison de la diminution de la concentration de certains enzymes respiratoires dont les cytochrome c et cytochrome oxydase. Il s'en suit une impossibilité de fonctionnement de la succinique deshydrogénase ce qui bloque le C.T.C. à ce niveau.

L'énergie nécessaire vient alors de la glycolyse et le Qco_2 passe par un maximum. Le rôle du C.T.C. se limite alors à fournir des métabolites nécessaires aux biosynthèses, comme l'α céto-glutarate, l'oxalo-acétate, etc... (GAY 1968). L'oxygène a donc un rôle inducteur même à faible pression et sans lui il n'y a pas de synthèse des enzymes respiratoires.

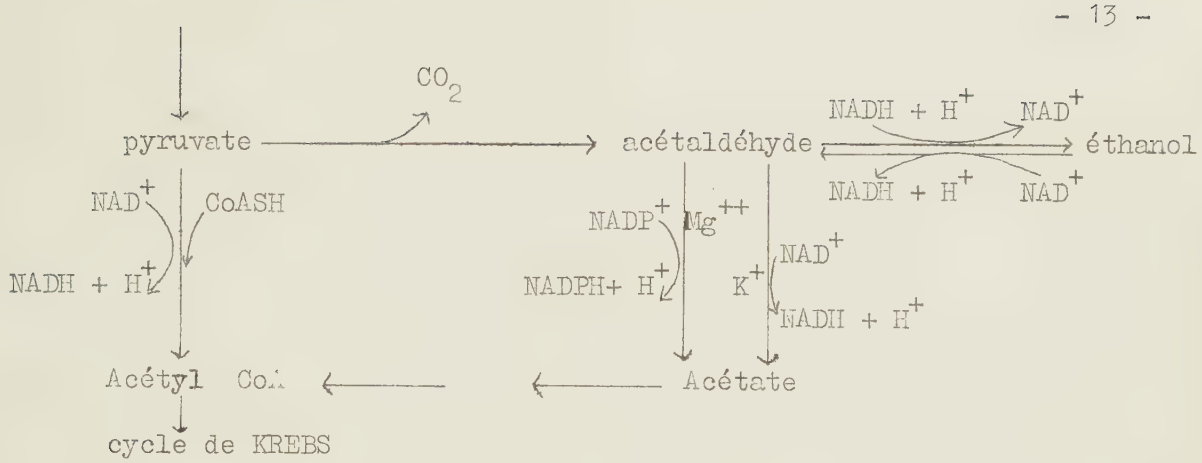


En conclusion, le contre effet PASTEUR opère au niveau de la synthèse des enzymes et il ne se manifeste donc que lors de la croissance.

C) VOIES METABOLIQUES DE DEGRADATION DES COMPOSES EN C_2 ET LEUR REGULATION

Les levures et en particulier le genre Saccharomyces sont des organismes capables de se développer à partir des composés en C_2 comme l'éthanol, l'acétate. Dans tous les cas, ces substrats ne peuvent être que respirés et ils nécessitent la présence d'oxygène pour leurs assimilations. Les travaux de SWANSON et CLIFTON (1948) laissaient donc supposer qu'il y avait une modification de l'équipement enzymatique entre la phase fermentation et la phase respiration.

HABOUCHA, MASSCHELEIN et DEVREUX (1959) et HABOUCHA, MASSCHELEIN (1960) s'intéressant à cette adaptation mettent en évidence une différenciation entre Saccharomyces cerevisiae et Saccharomyces carlsbergensis. En aérobiose, S. carlsbergensis utilise le glucose par fermentation puis l'éthanol accumulé par respiration ceci se traduisant sur la courbe de croissance par une diauxie. Le schéma réactionnel a été élucidé grâce aux travaux de BLACK, SEEGMILLER et SCHIMPFESSEL. En effet BLACK (1951) met en évidence une aldéhyde deshydrogénase (E.C. 1.2.1.5.) liée au NAD^+ et activée par les ions K^+. Cet enzyme transforme l'acétaldéhyde en acétate, mais est actif sur d'autres aldéhydes tels que le bultyraldéhyde et le benzaldéhyde. SEEGMILLER (1953) deux ans plus tard isole une deuxième aldéhyde deshydrogénase (E.C. 1.2.1.4.) spécifique du $NADP^+$ et activée par les ions Mg^{++}. Cet enzyme transforme également l'acétaldéhyde en acétate et est actif sur d'autres aldéhydes, mais pas sur le butyraldéhyde et le benzaldéhyde. Ces aldéhydes deshydrogénases réalisent des réactions qui ne sont pas réversibles expérimentalement. SCHIMPFESSEL (1964) confirme chez S. cerevisiae la pluralité des alcools deshydrogénases signalée par EBISUZAKI et BARRON (1957) et les différencie. L'enzyme I (alcool NAD^+ oxydoréductase) (E.C.1.1.1.1.) fonctionne dans le sens acétaldéhyde-éthanol c'est une alcool deshydrogénase fermentative, l'enzyme II (E.C. 1.1.1.1.) fonctionnant dans le sens éthanol-acétaldéhyde est une alcool deshydrogénase oxydative. La deuxième apparait et est prédominante dans la seconde phase "respiration de l'éthanol". L'ensemble de ces travaux se résume selon le schéma de SCHIMPFESSEL (1964).



Le rôle physiologique de ces aldéhydes deshydrogénases n'est pas encore élucidé à notre connaissance.

Cependant, on peut penser que cette dualité enzymatique correspond au sein de la cellule à deux fonctions physiologiques essentiellement différentes. Il apparait donc deux voies conduisant à l'acétyl CoA : la pyruvique oxydase et la séquence aldéhydes deshydrogénases-kinase. SCHIMPFESSEL suggère qu'en aérobiose la synthèse de l'acétyl CoA pourrait se faire ainsi selon deux voies en fonction des besoins énergétiques (pyruvique oxydase) ou biosynthétiques (aldéhydes deshydrogénases-kinase).

Un composé en C_2 comme l'éthanol ou l'acétaldéhyde est donc oxydé en acétyl CoA selon le schéma précédent. Par la suite et principalement chez la levure, c'est le shunt glyoxylique qui permet les différentes synthèses. De nombreux enzymes sont alors déréprimés lorsque le glucose est épuisé, en particulier l'isocitrate lyase et la malate synthase.

En conclusion, on sait finalement peu de choses sur la régulation de ces voies oxydatives et sa connaissance nous apportera des renseignements très précieux sur le phénomène de diauxie que l'on peut constater chez S. carlsbergensis.

D) RAPPORTS AVEC LA SYNTHESE DES ALCOOLS SUPERIEURS

L'origine des produits volatils de la fermentation a été étudiée depuis fort longtemps. Dès 1907, EHRLICH proposait un schéma réactionnel lié au métabolisme des acides aminés (GAY 1963).

$$R - \underset{}{\overset{NH_2}{\overset{|}{CH}}} - COOH \xrightarrow[-NH_3 - CO_2]{H_2O} R - CH_2\ OH$$

Ce schéma fut précisé par NEUBAUER (1913)

$$\underset{\text{Acide aminé}}{R - \overset{NH_2}{\overset{|}{CH}} - COOH} \xrightarrow{O} R - \underset{OH}{\overset{NH_2}{C}} - COOH \xrightarrow[-NH_3]{} \underset{\text{"céto acide"}}{R - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - COOH}$$

$$\text{"céto acide"} \xrightarrow{-CO_2} R - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - H$$

$$\underset{\text{alcool}}{R - CH_2OH} \xleftarrow{+2H} \underset{\text{Aldéhyde}}{R - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - H}$$

Les étapes principales sont donc la formation d'un céto-acide à partir d'un acide aminé, passage à l'aldéhyde et ensuite à l'alcool. Cette réaction a été élucidée depuis ; il s'agit d'un mécanisme faisant intervenir une transaminase et le phosphate de pyridoxal.

SENTHE, SHANMU, GENETHAN et ELSDEN (1958) proposent finalement

$$R'' - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - COOH \qquad R - \underset{NH_2}{\overset{|}{CH}} - COOH$$

$$\xrightarrow{\text{Transaminase}}$$

$$R' - \underset{NH_2}{\overset{|}{CH}} - COOH \qquad R - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - COOH$$

$$\xrightarrow{\text{Décarboxylase}} \quad \downarrow -CO_2$$

$$\underset{\text{Aldéhyde}}{R - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - H} \xrightarrow{\text{Deshydrogénase}} \underset{\text{alcool}}{R - CH_2OH}$$

Parallèlement à cette formation liée aux acides aminés, il existe un autre mécanisme à partir des glucides ou à partir des sources carbonées (GENEVOIS-BARAUD 1959) faisant intervenir des α céto-acides, squelettes carbonés destinés à la biosynthèse des acides aminés. Cependant les mécanismes sont loin d'être explicités ainsi que la proportion relative des différentes voies métaboliques conduisant à ces alcools.

D'autres produits volatils intervenant lors des fermentations sont des esters et des produits carbonylés. Le constituant majeur de ces derniers est l'acétaldéhyde, produit très volatil (température d'ébullition 20°C). De très nombreux travaux ont été consacrés à ce métabolite ainsi qu'à son évolution au cours de la fermentation.

Dès 1957, ENEBO établissait la courbe de production qui passe par un maximum au cours de la fermentation alcoolique de la bière. Lors de la fermentation continue, on constate le même phénomène qui est toutefois plus accentué. SANDEGREN - ENEBO (1961) expliquent cette accumulation et cette reprise, soit par un manque de NADH qui serait capté par une réaction préférentielle telle que la formation d'acide lactique, soit par la participation de l'acétaldéhyde à d'autres réactions parallèles telles que la formation d'acétoïne et de diacétyle.

Chez les levures la transformation acétoïne-diacétyle n'a pas été encore mise en évidence et elle est même actuellement contestée (CHUANG L.F., COLLINS E.B., 1968).

Cette évolution de l'acétaldéhyde a été étudiée également par RIBEREAU-GAYON et coll. (1953 et 1955) par fermentation du moût de raisin.

En 1963, DENSHCHIKOV, RYLKIN, ZHVIRBLYANSKAYA constatent le même phénomène sans apporter de preuves sur l'utilisation ultérieure de ce métabolite. Enfin, en 1966 NORDSTROM étudie les différentes voies que peut emprunter l'acétaldéhyde et montre que l'acétaldéhyde intracellulaire peut modifier la production d'acétate. Ce dernier est inversement proportionnel à la concentration intracellulaire de l'acétaldéhyde. En 1968, cet auteur étudie également l'introduction d'éthanol et constate une diminution de la quantité d'acide acétique formé.

Tous ces travaux montrent bien l'importance des dérivés carbonylés dans le métabolisme des levures. Ils interviennent directement comme l'acétaldéhyde dans les produits volatils des boissons fermentées. Ce sont des intermédiaires importants dans la synthèse des alcools supérieurs. Il est d'autre part intéressant de noter qu'"in vitro" le passage de l'alcool à l'acétaldéhyde, et la réaction inverse, sont catalysés par des alcools - NAD^+ oxydo-réductases. Celles-ci interviennent dans la transformation des composés en C2, C3, C4 et C8 c'est-à-dire éthanol, n propanol, isopropanol, n butanol, isobutanol, butanol, secondaire et n octanol. Ainsi SCHIMPFESSEL (1964) étudie les spécificités aux substrats et met en évidence chez S. cerevisiae des spectres d'activités identiques en culture aérobie ou anaérobie avec glucose comme substrat. Par contre sur éthanol et lactate les spécificités sont différentes et l'activité est beaucoup plus forte pour les alcools supérieurs en C3 et C4. Au cours du cycle de croissance chez S. cerevisiae on constate la même évolution des spécificités en raison du passage de l'alcool deshydrogénase I à l'alcool deshydrogénase II. Il n'est pas impossible en conséquence d'envisager une alcool deshydrogénase II participant au métabolisme des alcools supérieurs. Cette hypothése n'a cependant pas encore été confirmée.

MATERIELS ET TECHNIQUES UTILISES

A) CULTURES

1) Souches de levures

Pour l'étude envisagée nous avons utilisé principalement deux souches de levures de brasserie : S. carlsbergensis n° 80 et S. cerevisiae n° 59. Accessoirement nous avons utilisé d'autres souches basses comme les n° 104 et 108. Toutes ces souches de levures proviennent de la collection de l'Ecole Supérieure de Brasserie-Malterie et de Biochimie Appliquées (NANCY).

2) Milieux de cultures

Deux milieux différents ont été utilisés contenant soit 1,5 g/l (G.1,5) soit 4,5 g/l (G. 4,5) de glucose (BOURGEOIS, Ecole de Brasserie - Communication personnelle). Tous les autres composants sont les mêmes et se répartissent en :

Nature	P M	Pg/l	V ml	Mol
$PO_4 H_2 K$	136,09	1,088		M/100
$PO_4 H Na_2, 12 H_2O$	358,14	0,716		pour PO_4
$SO_4 (NH_4)_2$	132	1,320		M/100
$C_6 H_{12} O_6$	180	(1,5 4,5		M/120 M/120
Vitamines			10	
Cendres de levures		0,500		

La solution de facteurs de croissance se compose de :

NATURE	QUANTITE EN mg/100 ml solution mère
- Mesoinositol	500
- Panthoténate de Ca	25
- Biotine	0,2
- Aneurine (B_1)	20
- Pyridoxine (B_6)	4
- Acide nicotinique	60
- Paraaminobenzoate	80

Le milieu définitif est finalement stérilisé par filtration. Le pH final est de 6,2.

3) Techniques de cultures

a) Entretien des souches

Les souches sont conservées en double sur le milieu gélosé (2 %) précédemment décrit : une culture est à 25° et est repiquée régulièrement, une autre est à 0° et sert de réserve.

b) Préculture

Les précultures se font sur milieu Yeast Extract (0,5 %) glucosé (2 %) à 25° et non agitées. Elles durent 48 h et se font dans une fiole d'Erlenmeyer de 50ml à col étroit de façon à limiter l'arrivée d'oxygène. Ces conditions permettent d'obtenir un innoculum avec un potentiel respiratoire très faible. MASSCHELEIN a montré qu'il y a augmentation de la diauxie dans ces conditions.

c) Cultures

Elles se font dans des fioles d'Erlenmeyer modifiées par adjonction de deux tubulures selon le modèle de WIAME et STORCK (1953), l'une permet les mesures de densités optiques, l'autre permet le remplissage et l'ensemencement. Le volume total de la fiole est d'environ 350 ml et chacune contient 50 ml de milieu.

Les levures récoltées sont centrifugées, lavées deux fois par une solution NaCl 8,5 °/₀₀ puis ajustées à une densité optique de 1,4. L'ensemencement se fait dans les fioles précédentes à raison d'un millilitre par récipient. La d.o. de départ est d'environ 0,040. Sauf indications contraires, les flacons sont obstrués par un bouchon en "versilic" n° 3 traversé par une aiguille B.D. Mérieux n° 22 bouchée au coton cardé ce qui limite sensiblement les échanges avec l'extérieur. Les cultures en anaérobiose ont été réalisées en vase clos avec une évacuation initiale de l'oxygène dissous dans le milieu par un barbotage d'azote stéril pendant une heure.

Les cultures sont agitées par un dispositif particulier : un plateau animé d'un mouvement d'oscillation d'amplitude 5 cm. Le nombre d'agitation est d'environ 80 par minute. Un autre système a été également utilisé pour augmenter l'aération. Les bouchons en "versilic" sont remplacés par des cotons et les cultures sont agitées sur un appareil Asti 250 tours/mn, d'excentration 5 cm.

B) ETABLISSEMENT DES COURBES DE CROISSANCE

Les courbes de croissance sont établies par turbidimétrie à l'aide d'un colorimètre Beckman modèle C, muni d'un filtre rouge dont la transmission maximum est à 660 mμ. D'autre part ce filtre est atténué pour obtenir une meilleure stabilité du 100 de transmission déterminé avec un échantillon non ensemencé.

Les mesures de d.o. (densité optique) sont effectuées toutes les 2 ou 4 heures selon les étapes de la courbe de croissance.

Dans de nombreuses expériences, il est nécessaire d'établir la correspondance entre la d.o. et la quantité de levures exprimée soit en mg de poids sec par ml, soit en millions (M) de microorganismes par ml. Parallèlement il a été établi une correspondance entre notre dispositif cylindrique de mesure de d.o. et une cuve carrée de section 1 cm2 (figure 1).

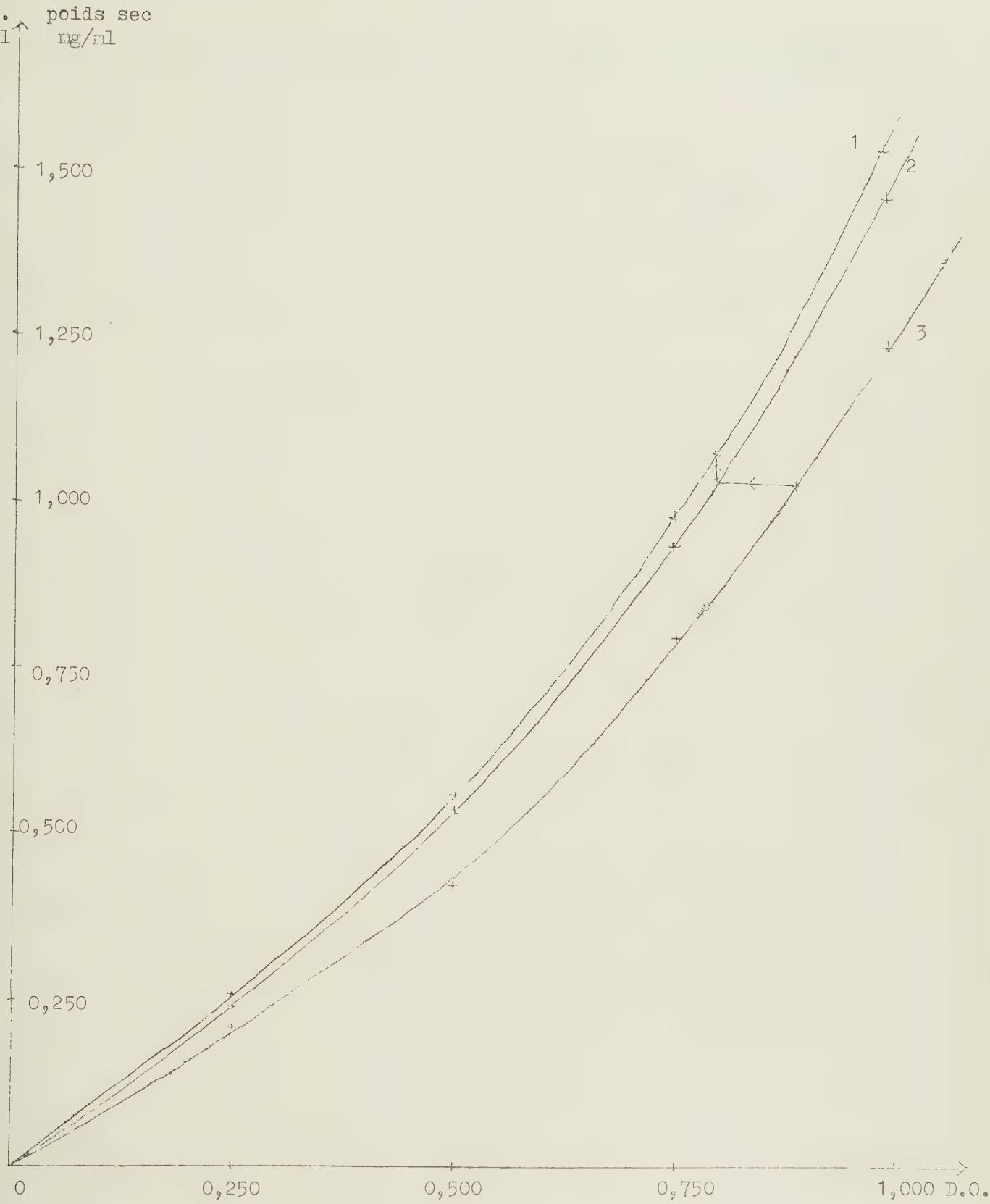


Fig 1 Correspondances pour S. carlsbergensis n° 89 entre

1) poids sec et D.O. cuve carrée
2) population et D.O. cuve carrée
3) population et D.O. cuve ronde

C) DETERMINATION DES SUBSTANCES VOLATILES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1) Matériel

Nos essais de séparation des produits volatils par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisés avec un appareil MECI possédant à la fois la détection par thermoconduction et par ionisation de flamme. C'est ce dernier mode de détection qui a été utilisé en raison de son insensibilité à l'eau et de sa plus forte sensibilité pour les produits nous intéressant.

L'appareil ne possède pas la programmation de température, les détecteurs et l'injecteur étant placés dans l'armoire d'analyse commune avec les colonnes. La température affichée sur les chromatogrammes correspond donc à celle du four, du détecteur et de l'injecteur. La régulation de la température est réalisée par un systéme D.A.T. (Duration Adjusting Type) thermique MECI, type G, à fonctionnement discontinu. L'enregistreur potentiométrique est un appareil MECI "speedomax G" type E à une direction et à deux vitesses de déroulement du diagramme : 609,6 et 1 828,6 mm/h.

2) Conditions de travail

En fonction de l'étude que nous nous proposions et en se référant à la littérature, nous avons testé plusieurs colonnes :

- chromosorb W 80/100 mesh imprégné de 10 % de triéthanol amine (T.E.A.) selon les travaux de ARBOGAST-MAILLARD-URION (1965) et MORGAN (1965).
- chromosorb W 60/80 mesh, A.W., imprégné à 20 % de 1,2,3 tris (2 cyano ethoxy) propane (T.C.E.P.) selon KEPNER-STRATING-WEURMANN (1963)
- chromosorb W 60/80 mesh A.W. imprégné à 10 % de carbowax 1500
- aæropak 30 100/120 mesh, imprégné à 10 % de carbowax 1500

C'est la phase stationnaire carbowax 1500 que nous avons retenue malgré les trainées que l'on obtient sur les pics de l'acétaldéhyde et de l'éthanol lorsque ceux-ci sont injectés en grande quantité. Nous avons essayé le support Aéropak 30 (chromosorb spécialement traité) afin de limiter ce phénomène. Les résultats n'ont pas été meilleurs.

Nous sommes donc revenus à la solution précédente car elle nous donne la meilleure séparation malgré l'absence de programmation de température.

Les chromatogrammes ont été réalisés avec une double colonne d'une longueur totale de 3 m et d'un diamètre intérieur de 6 mm.

Les injections se font à l'état gazeux par seringue hypodermique étanche aux gaz. On a utilisé dans tous les cas la technique du "Head Space" de BRADLEY-STINE (1962) et de KEPNER-STRATING-WEURMAN (1963). Les échantillons sont placés 3 heures à 35° après addition de 18 g de ClNa, destiné à augmenter la pression partielle des produits volatils. Le coefficient K de la loi de HENRY est alors augmenté par modification de la force ionique de la solution.

Nos conditions de travail sont les suivantes :

- utilisation de l'ionisation de flamme dans tous les chromatogrammes
- Débits gazeux fixés aux valeurs suivantes :

  H_2 = 2l/h N_2 = 2,5 l/h Air = 12,5 l/h
- Température du four : 70° pour toutes les expériences
- Injection gazeuse selon la technique "Head Space" par seringue de 10 ml.

3) Mesures quantitatives et courbe d'étalonnage

Les mesures quantitatives ont été réalisées avec des solutions aqueuses d'acétaldéhyde de titre connu placées dans les mêmes conditions expérimentales que les fermentations (température, adjonction de ClNa, etc ...). Des courbes d'étalonnage ont été établies pour la sensibilité 1 et la sensibilité 3 (fig. 2) Une étude comparée entre surface et hauteur des pics a montré que le calcul de la surface des pics par planimètre apportait peu de précision supplémentaire lorsque les conditions expérimentales étaient les mêmes. En conséquence la hauteur des pics a seule été prise en considération. Elle permet de ne pas faire de correction avec les différentes vitesses de déroulement de l'enregistrement.

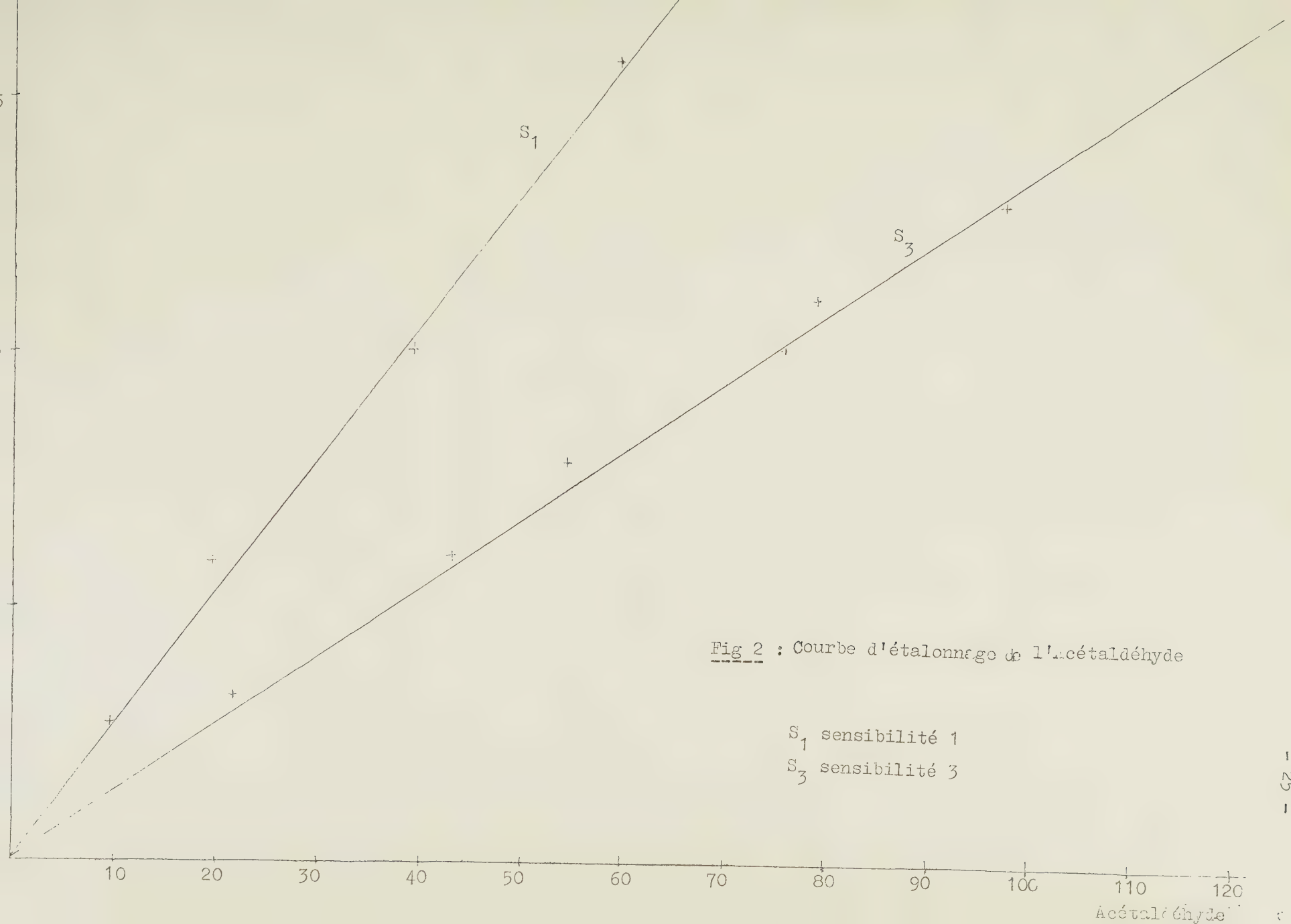


Fig 2 : Courbe d'étalonnage de l'acétaldéhyde

S_1 sensibilité 1

S_3 sensibilité 3

D) DETERMINATION DU QO_2

Cette détermination se fait au Warburg selon UMBREIT-BURRIS et STAUFFER (1964) et a été réalisée avec S. carlsbergensis. L'expérience se fait à 30° dans les conditions opératoires suivantes :

- 1,7 ml de suspension de levure (d.o. 0,6)
- 0,2 ml de KOH 20 %
- 0,3 ml de glucose 2 %

L'agitation est de 140 oscillations par minute et le pH est de 4,5. Toutes les expériences ont été faites en double à partir du même état physiologique de la levure.

La culture ayant atteint une d.o. déterminée est centrifugée, et les levures récoltées sont lavées dans un tampon PO_4 H K_2 M/15 pH 4,5. La d.o. de la levure à étudier est fixée à 0,600 ce qui correspond selon la figure 1 à un poids sec de 0,610 mg/ml. La mesure de l'absorption de l'oxygène se fait toutes les 10 minutes et l'expérience dure une heure et demie.

E) DOSAGE DU GLUCOSE DANS LE MILIEU FERMENTAIRE

La détermination du glucose et l'étude de son absorption au cours de la croissance ont été réalisés avec l'appareil Technicon en méthode directe. On utilise la réaction d'oxydo-réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure de potassium selon HOFFMAN (1937). La solution jaune au départ se décolore et cette décoloration est mesurée à 420 mμ dans une cuve de colorimètre tubulaire à flux continu de 15 mm.

La composition du réactif est la suivante :

ClNa	9,0 g
$Fe(CN)_6 K_3$	0,25 g
$CO_3 Na_2$	20 g
eau distillée q.s.p.....	1 000 ml
Brij 35	0,5 ml

La culture ayant atteint une d.o. déterminée est centrifugée. Le liquide surnageant est stérilisé par filtration sur membrane et sert après dilution convenable à la mesure directe de la quantité de glucose grâce à une courbe d'étalonnage (figure 3).

F) DOSAGE DE L'AZOTE DANS LE MILIEU FERMENTAIRE

Le dosage de l'azote se fait à l'aide de l'appareil Technicon en mesure directe. On utilise la réaction spécifique à la ninhydrine, selon VAN SLYKE, DILLON, MAC FAYDYEN, HAMILTON (1941-1943) et MOORE, STEIN (1948).

Le réactif a la composition suivante :

ninhydrine	6,4 g
hydrindanthine	0,48 g
544 g d'acétate de Na + 100 ml d'A. Acétique fumant	
q.s.p. 1 000 - pH 5,5	112 ml
Méthyl Cellosolve	848 ml
eau distillée q.s.p.	1 600 ml

Filtre 420 mμ

La coloration se développe à 95°C et les quantités d'azote sont déterminées grâce à un test sur une solution connue. Comme solution de départ, nous avons employé le milieu de culture à 280 mg d'azote/l. utilisé lors de nos essais L'application de la formule :

$$280 \times \frac{A'}{A} \times \frac{d'}{d}$$

nous a permis de déterminer les teneurs en mg d'azote/l. A et d correspondent respectivement à la d.o. et à la dilution du témoin et A' et d' à celles de la solution inconnue. Toutes les dilutions sont réalisées dans HCl N/10.

On néglige la quantité d'acides aminés libérés dans le milieu. Elle est de l'ordre de 1 %. (BOURGEOIS - Ecole de Brasserie - Communication personnelle).

G) DOSAGE DE L'ACTIVITE DES ALCOOLS DESHYDROGENASES

1) Préparation de l'extrait

La levure est récoltée à différentes étapes au cours du cycle de croissance. Elle est filtrée sur membrane Millipore de telle sorte que le poids sec de levure recueilli soit supérieur ou égal à 100 mg. Le tout est porté au congélateur à -20°.

Le broyage est ensuite réalisé avec du sable de FONTAINEBLEAU sans décongélation selon une méthode dérivant de celle de RACKER (1950), mais plus rapide. Nous opérons ainsi : la membrane Millipore supportant les levures est immergée dans l'azote liquide. Le sable est ajouté ensuite, et les levures sont broyées au mortier sous azote liquide pendant 10 minutes. Avant décongélation, on ajoute 5 cm^3 de tampon phosphate 0,066 M (PO_4 H Na_2) que l'on broye avec l'ensemble levure-sable-membrane. On laisse ensuite décongeler lentement.

On recueille le tout dans un Erlenmeyer de 50 ml, puis on rince le mortier par 5 ml du même tampon phosphate.

L'extraction plus avant des protéines est réalisée à ce stade par une sonation dans la glace sur appareil MSE à 20 K. cycles. Le temps de traitement est de 15 mn. On effectue alors une solubilisation des enzymes par une forte agitation à 35° pendant 45 mn. L'extrait est séparé en deux : une partie est traitée 15 mn à 55°, la deuxième 15 mn à 61°. Comme nous le verrons ce double traitement doit permettre de doser l'alcool deshydrogénase I et II à 55° et la II à 61° après dénaturation de la I. Cette méthode dérive de celles employées par RACKER (1950) et SCHIMPFESSEL (1964). Le traitement à 55° a été fait pour obtenir une meilleure stabilité du NADH formé lorsque l'on utilise certaines souches de levures. Cependant, d'après les travaux de SCHIMPFESSEL ce traitement thermique entraine une diminution d'activité pour l'alcool deshydrogénase I. Chaque fraction subit une centrifugation de 15 mn à 10 000 tours/mn sur appareil PHYWE muni d'une refrigération.

2) Dosage des protéines

Cette détermination se fait selon la méthode au biuret. La référence utilisée est l'albumine humaine (BIOLYON) à 8 mg/100 ml solution mère que l'on dilue ensuite à 2°/₀₀ .

D'après GORNALL, BARDAWILL, DAVID (1959) une courbe d'étalonnage est établie selon le tableau suivant :

solution	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6	n°7	n°8	n°9	n°10	n°11
albumine humaine 2°/₀₀ (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
eau phys. (9°/₀₀) ml	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
biuret en ml	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Concentration en albumine hum. (g°/₀₀)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2

On laisse incuber 30' et on lit 540 mμ au spectrophotomètre.

D.O.	0,012	0,020	0,065	0,082	0,112	0,142	0,168	0,200	0,231	0,256	0,281

La mesure sur une solution inconnue se fait en mélangeant 1 ml de protéin 1,5 ml d'eau physiologique à 9°/₀₀ de ClNa et 2,5 ml de biuret. Le témoin ne contient que 10 ml d'eau physiologique et 10 ml de biuret. Si la teneur en protéines est trop forte, on effectue une dilution pour être dans les limites de la courbe d'étalonnage (fig. 4).

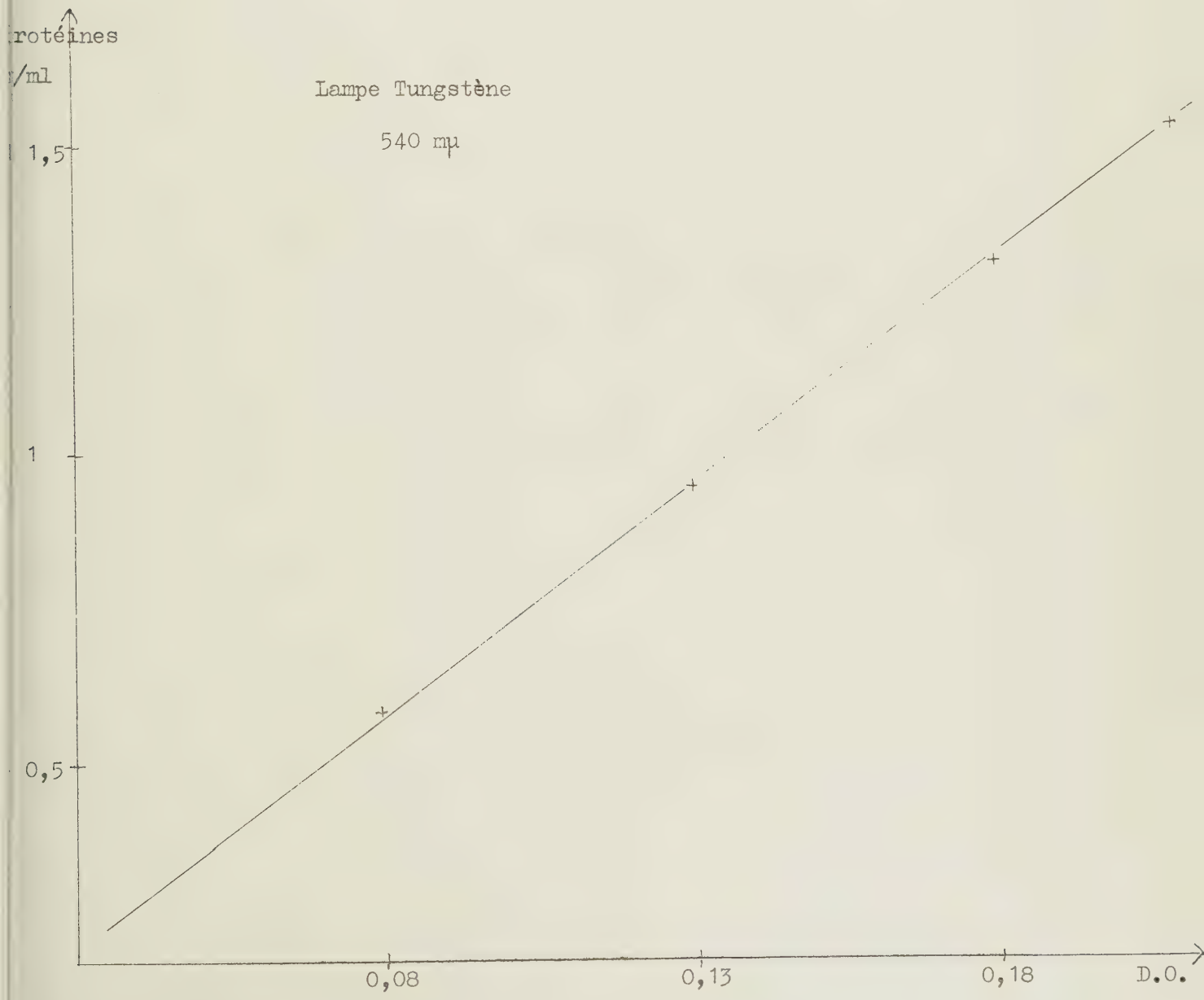


Fig 4 : Courbe d'étalonnage protéines en fonction de la D.O. par la méthode au biuret

3) Mesure de l'activité au spectrophotomètre

Les appareils utilisés sont respectivement un Perkin Elmer à double faisceau et à enregistreur, modèle 4 000 A, et un Beckmann D.U. La longueur d'onde est fixée à 340 mμ et la réaction enzymatique se produit dans les conditions suivantes :

	Cellule réactionnelle	Cellule témoin
Eau distillée	1,3 ml	1,4 ml
Tampon pyrophosphate 0,06 M pH 8,5	0,5 ml	0,5 ml
Enzyme	1 ml	1 ml
NAD^+ 0,006 M	0,1 ml	0,1 ml
Ethanol 3 M	0,1 ml	-

La réaction est amorcée par addition du substrat. Une unité d'enzyme est définie par la quantité de NADH en micro-moles formé par mn dans les conditions précédentes. Les trois premières minutes de la réaction sont seules relevées. La vitesse de la réaction à t = o est prise en considération et la différence de densité optique entre 15 et 45 secondes, multipliée par deux, donne l'évolution de la d.o. par minute. L'activité spécifique est exprimée en unités par milligramme de protéines. La quantité de micro-moles de $NADH^+$ formé est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{d.o.}{\varepsilon \times 1}$$

ou

C = concentration en moles/ml

d.o. = d. optique théorique à 1 minute

ε = coefficient d'extinction de $NADH^+$ soit $6,22 \times 10^6$

1 = trajet optique en cm soit 1 cm

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) COURBES DE CROISSANCE DES DIFFERENTES LEVURES

1) Agitation douce - Aération limitée

A partir des conditions expérimentales décrites précédemment, il a été possible d'établir par turbidimétrie les courbes de croissance de S. carlsbergensis et S. cerevisiae. Dans le cas présent, il y a 80 oscillations par minute et les flacons sont obstrués par un bouchon "versilic" traversé par une aiguille.

La figure 5 représente les courbes obtenues avec les deux levures sur le milieu à 4,5 g de glucose/l soit G 4,5.

La figure 6 traduit le même phénomène lorsque la concentration en glucose est fixée à 1,5 g/litre soit G 1,5. Dans ce dernier cas, et pour S. carlsbergensis, on peut nettement observer une diauxie comme l'ont montré les travaux de MASSCHELEIN et coll. (1959). Par contre, sur la figure 5 lorsque l'on suit l'évolution de la d.o. le phénomène de diauxie n'est pas visible.

Il est cependant important de signaler que cette diauxie traduisant une variation dans le métabolisme n'a été obtenue que pour une souche de S. carlsbergensis ayant poussé sur moût juste avant notre expérimentation. La même souche cultivée sur milieu synthétique depuis plus d'un an s'est montré réticente à cette apparente diauxie.

Fig 5 : Courbes de croissance sur milieu G 4,5

Agitation lente 80/mn

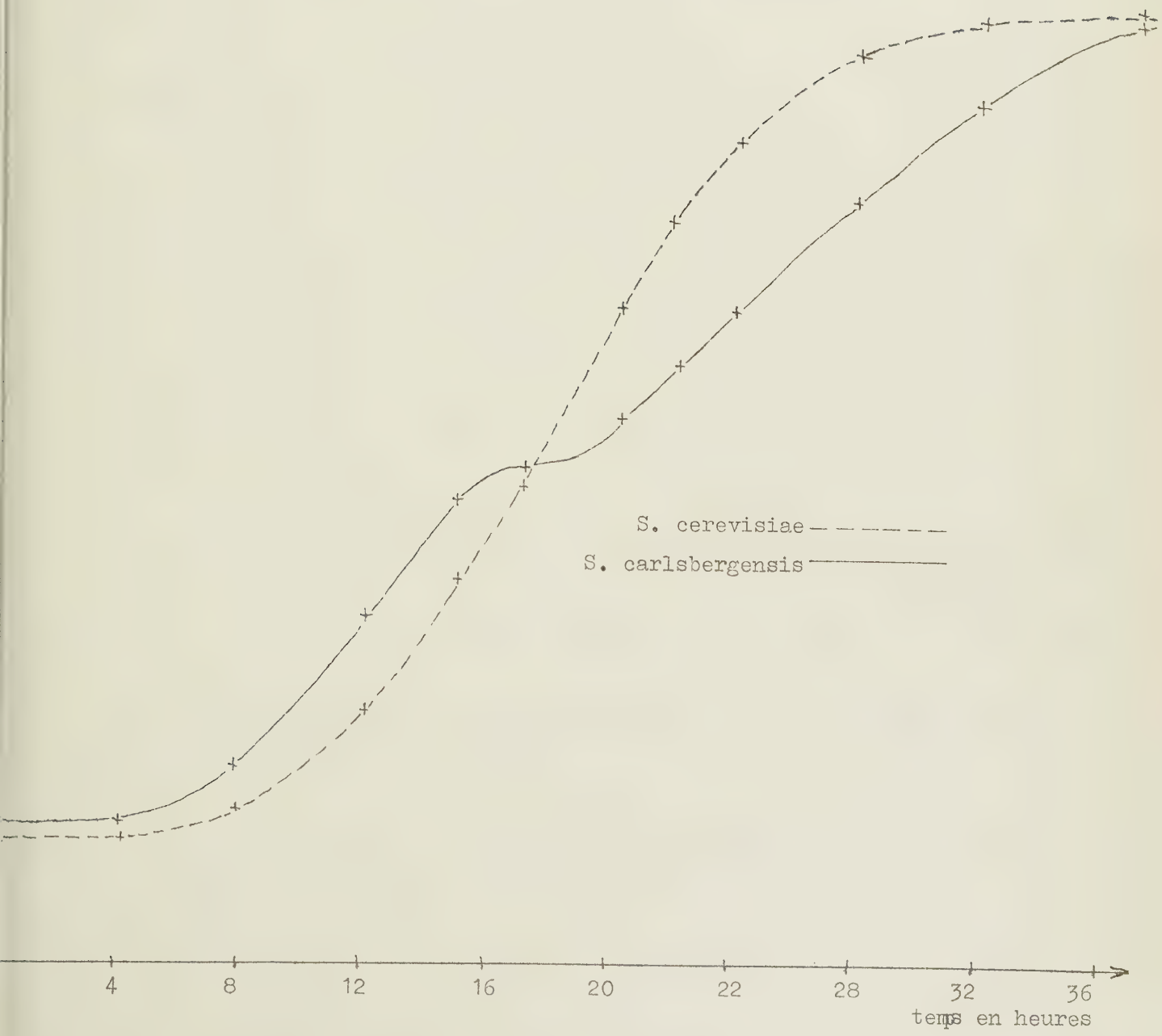


Fig 6 : Courbes de croissance sur milieu G 1,5

La comparaison de ces deux types de courbes amène d'autres constatations :

1) Comme prévu, le rendement cellulaire est plus important lorsque le glucose est en forte concentration. Le dosage de l'azote résiduel ainsi que sa disparition lors de la fermentation montre en effet que celui-ci n'est pas limitant (fig 7) pour l'une ou l'autre des espèces envisagées.

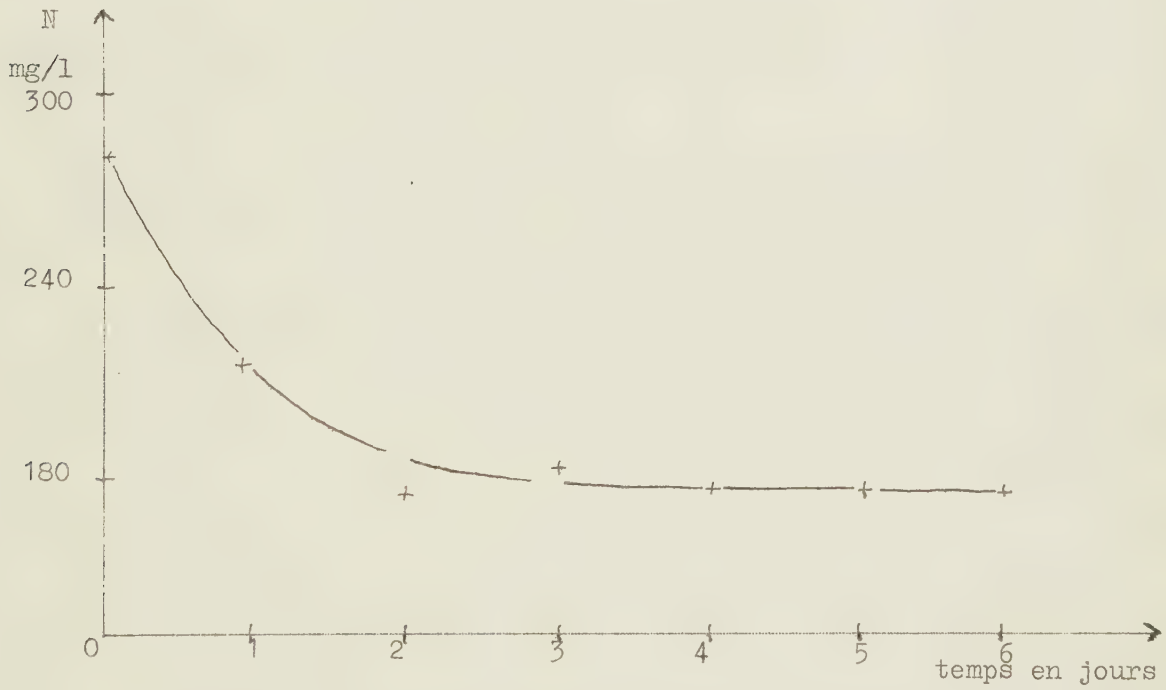


Fig 7 : Disparition de l'azote pour G 4,5 avec S. carlsbergensis

2) Le temps de génération est plus court pour S. cerevisiae que pour S. carlsbergensis sur le milieu G 4,5.

3) La d.o. finale de S. cerevisiae est sensiblement celle de S. carlsbergensis ce qui est en accord avec les travaux de MASSCHELEIN et coll.

2) Agitation forte - Aération libre

Dans ces expériences l'agitation est effectuée à 250 tours par minute avec un matériel Asti. De plus, la tubulure latérale des fermenteurs est obstruée par un tampon en coton cardé, laissant passer l'air en quantité plus importante que dans le cas précédent

La figure 8 est établie avec G 4,5 , la figure 9 avec G 1,5. On peut constater :

1) sur G 4,5 et G 1,5 les temps de génération de S. cerevisiae et de S. carlsbergensis sont augmentés.

2) Sur G 1,5 il se produit pour S. carlsbergensis un phénomène de diauxie très étalé dans le temps.

3) Les paliers de d.o. correspondent à ceux de l'expérience précédente (agitation douce) pour les mêmes concentrations en glucose ce qui confirme nos résultats.

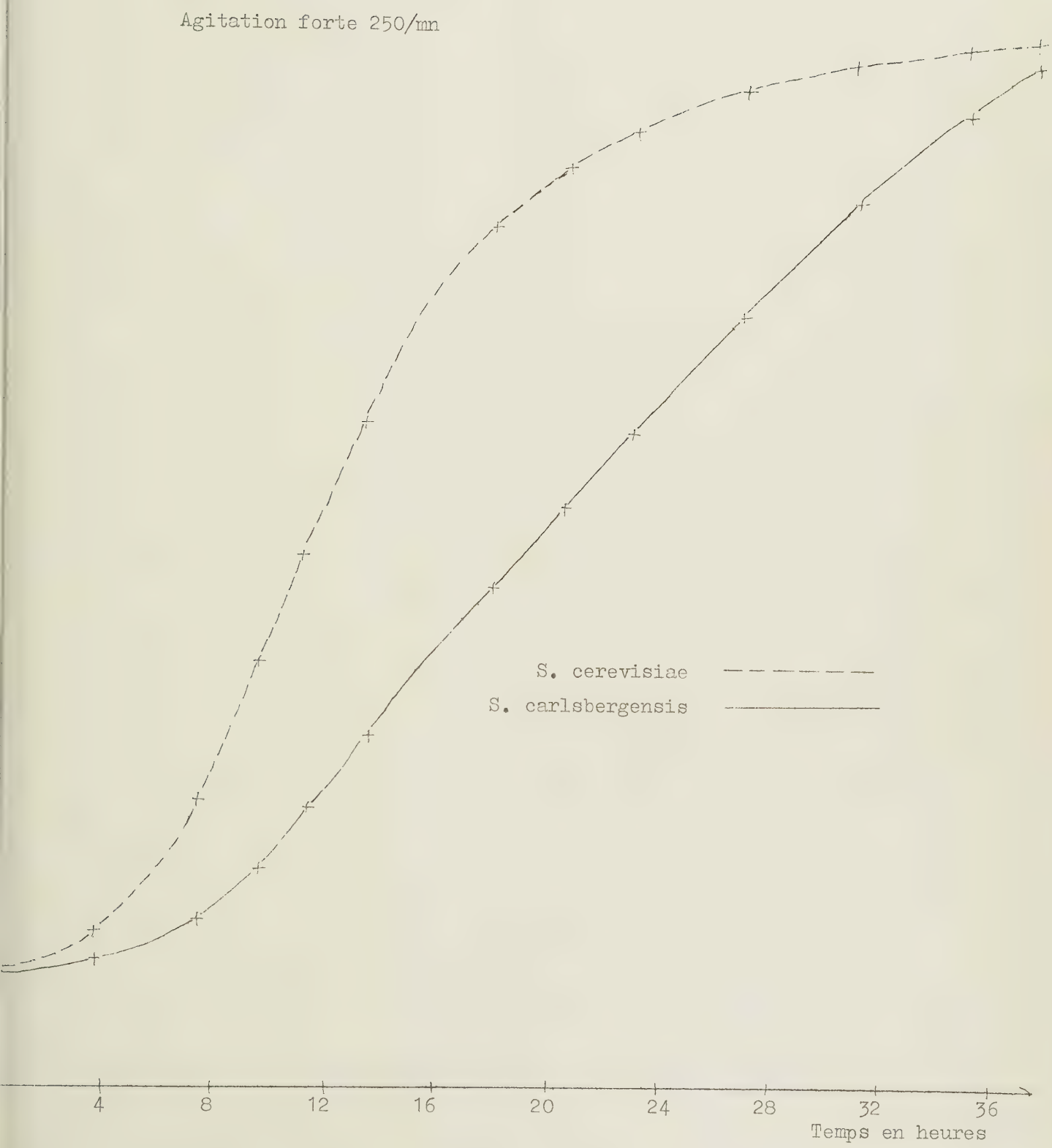


Fig 8 : Courbes de croissance sur milieu G 4,5

Agitation forte 250/mn

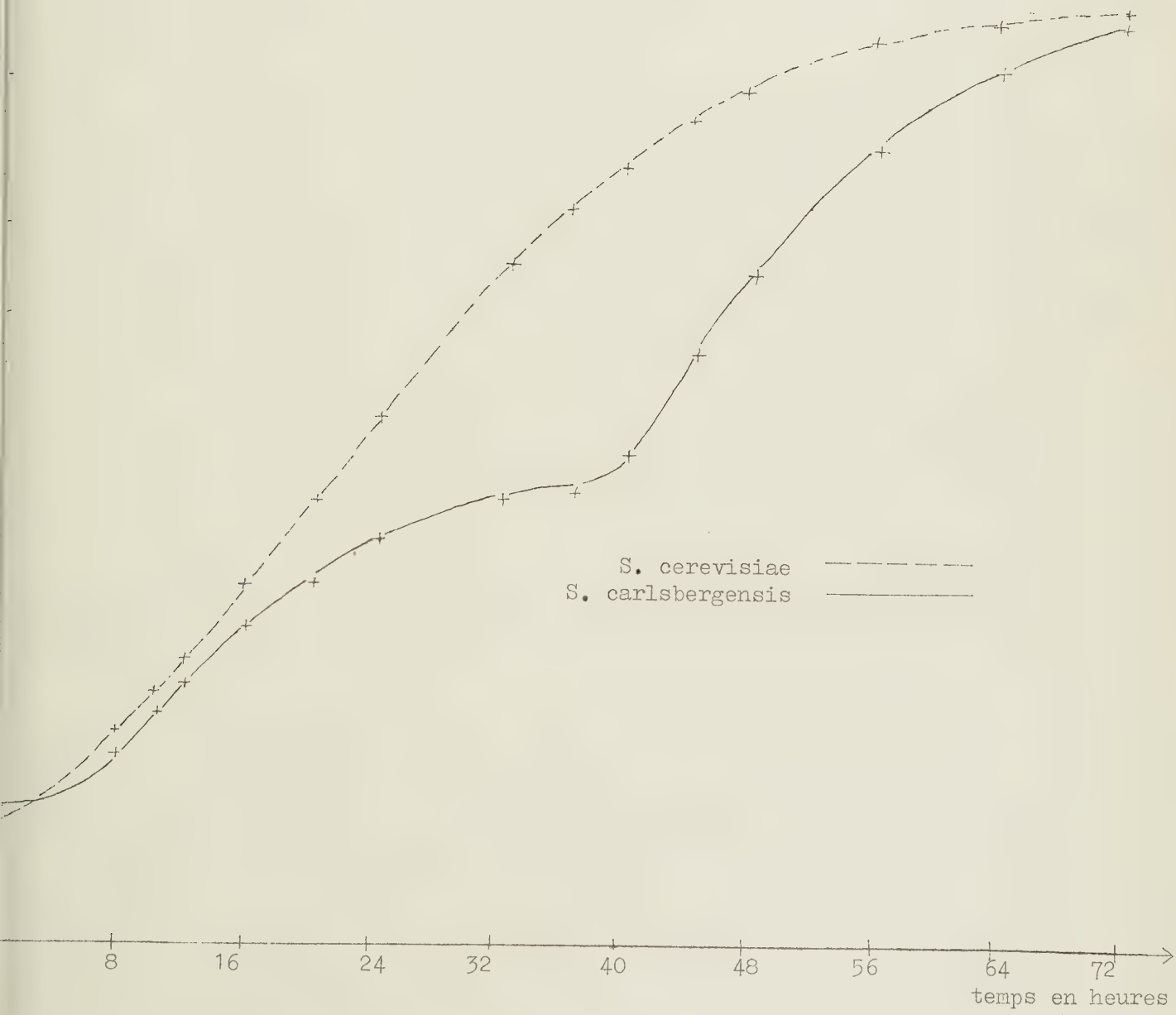


Fig 9 : Courbes de croissance sur milieu 1,5

B) PRODUCTION D'ACETALDEHYDE

1) S. carlsbergensis

Compte tenu des résultats obtenus dans la croissance, ce dosage a été réalisé uniquement en agitation lente, donc aération limitée et sur les deux milieux glucosés G 4,5 et G 1,5.

On obtient une accumulation très importante d'acétaldéhyde sur le milieu G 4,5 et avec S. carlsbergensis.

La figure 10 représente les chromatogrammes obtenus après 24 (a) 48 (b) et 72 heures (c) de fermentation. Une courbe plus précise et quantitative peut être établie en fonction de la d.o. et pendant environ les 36 premières heures de fermentation (fig 11a) . Le maximum de production varie quelque peu selon les conditions de travail, mais dans tous les cas, il avoisine ou dépasse 120 ppm et se situe entre une d.o. de 0,650 et une d.o. de 0,750. L'accumulation est lente par contre la reprise est beaucoup plus rapide.

La même expérience faite toujours avec S. carlsbergensis mais avec G. 1,5 montre un phénomène très atténué (fig 11 b) à la limite des possibilités de dosage de l'acétaldéhyde par notre méthode.

En travaillant en anaérobiose stricte, on obtient la suppression de ce phénomène, c'est-à-dire aucune accumulation d'acétaldéhyde ne se produit au cours du cycle de croissance.

2) S. cerevisiae

La même étude a été faite avec S. cerevisiae souche n° 59. Il nous a été impossible de mettre en évidence l'accumulation et la réutilisation de l'acétaldéhyde en aérobiose (fig 12) après 24 (a), 48 (b), 72 (c) et 96 (d) heures.

Il apparait donc une différence primordiale entre ce microorganisme et les autres testés. En effet, la même expérience réalisée sur S. pastorianus ou d'autres levures d'infections en brasserie montrent toutes une production d'acétaldéhyde beaucoup plus étalée, c'est-à-dire que l'accumulation et la réutilisation se font très lentement, pendant 3 × 24 h pour S. pastorianus et 6 × 24 h pour une levure appelée "TORULA" en brasserie et dont l'identification n'a pas été réalisée. Ceci s'oppose très nettement au phénomène observé chez S. carlsbergensis où la réutilisation est terminée après 36 heures. Signalons également que l'évolution des courbes de croissance est sensiblement la même, à part bien sûr la d.o. de la phase stationnaire et que ce facteur ne peut être mis en cause dans les différences observées.

Echantillon	Head Space
App.	Léci
Colonne	Carbo. 1500
T° colonne	70°
Gaz porteur	N_2
	Débit 2,5 l/h
Vol. injecté	10 ml
Déroulement	609,6 mm/h
Sensibilité	1
Débit H_2	2 l/h
Débit air	12,5 l/hl

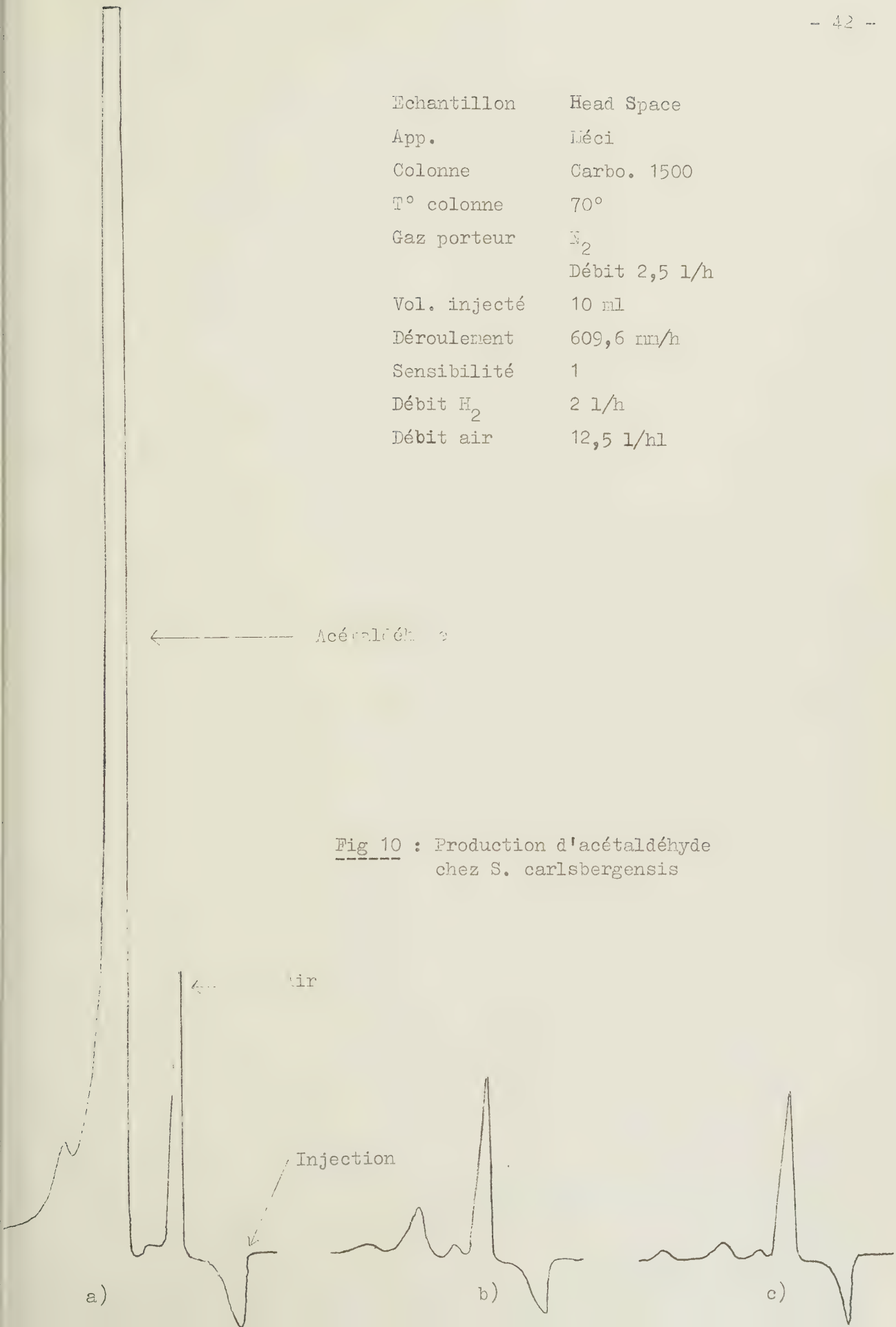


Fig 10 : Production d'acétaldéhyde chez S. carlsbergensis

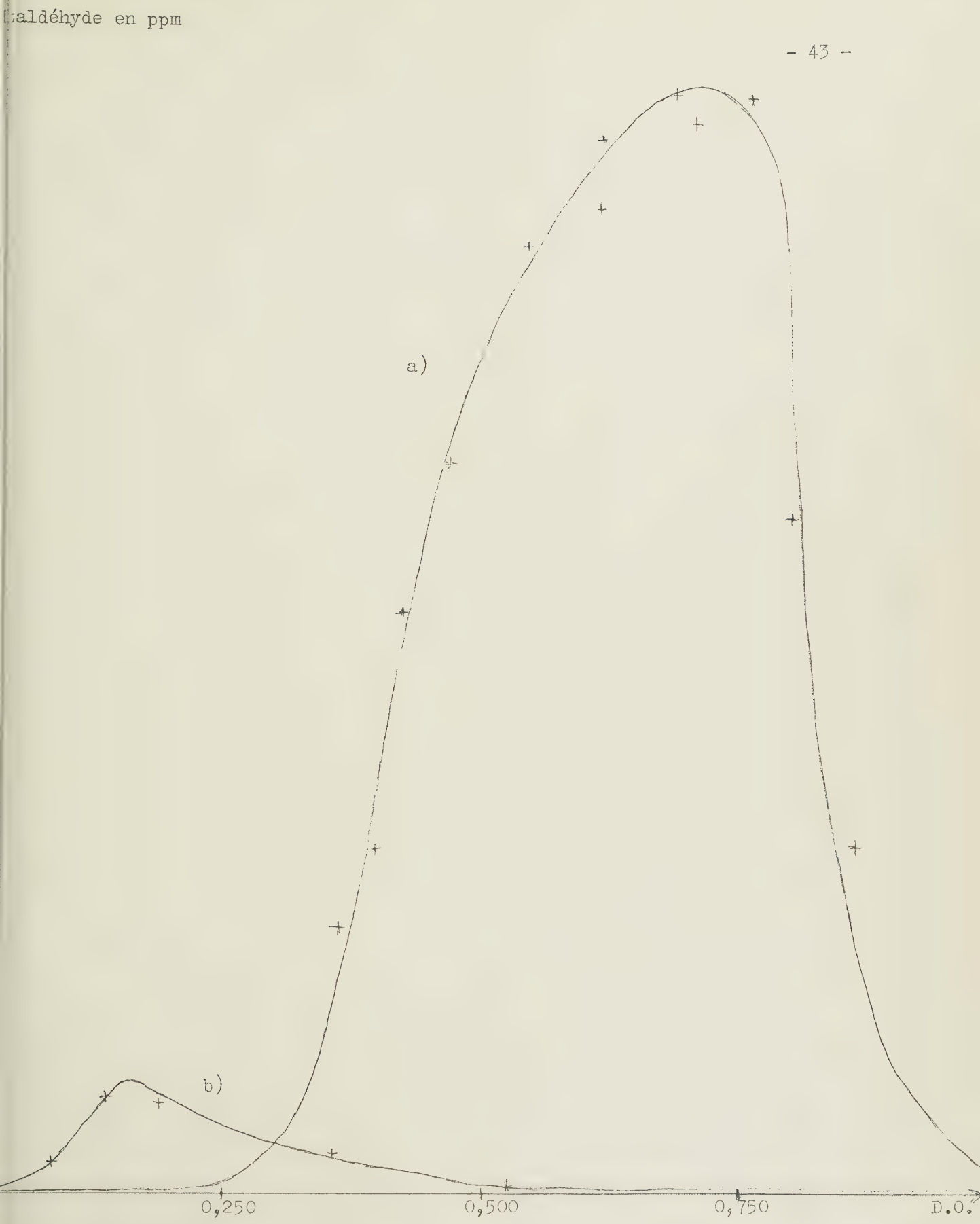


Fig 11 : Evolution de la production d'acétaldéhyde chez S. carlsbergensis sur G 1,5 (b) et G 4,5 (a)

Fig 12 : Absence de production d'acétaldéhyde chez S. cerevisiae

C) EVOLUTION DU QO_2 ET ABSORPTION DU GLUCOSE

Compte tenu des résultats obtenus en aérobiose, agitation lente et milieu G 4,5 nous nous sommes efforcés d'expliquer ce phénomène en faisant une étude du métabolisme de la levure S. carlsbergensis.

1) Evolution du QO_2

L'évolution du QO_2 au cours de la croissance donne les résultats suivants (double échantillonnage) :

d.o. de la culture		0,050	0,230	0,360	0,470	0,600	0,750	0,900
QO_2	1	17,5	27,1	47,6	56,6	62,4	73,4	65,9
	2	18,8	28,5	48,9	56,8	63,6	72,6	64,4

La courbe de la figure 13 traduit cette évolution. Elle est en opposition apparente avec celle de EPHRUSSI, SLONIMSKI et coll. (1956) où le QO_2 passe un minimum. Cette différence vient essentiellement des conditions de préculture.

EPHRUSSI et SLONIMSKI (1956) font une préculture aérée que l'on évite dans nos conditions expérimentales. Nous obtenons une augmentation du QO_2 en fin de culture, ce qui correspond bien à un métabolisme oxydatif de l'éthanol.

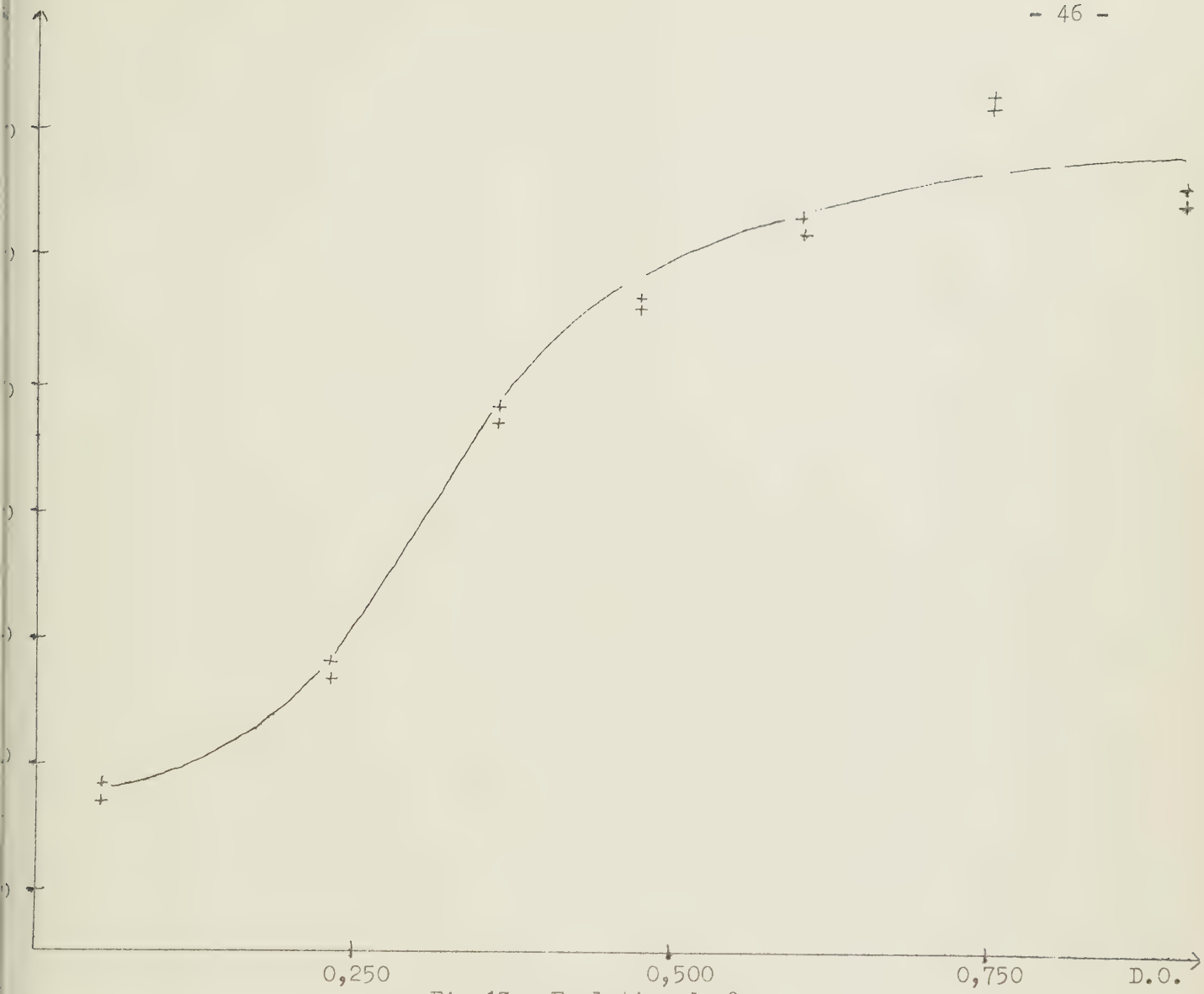


Fig 13 : Evolution du Qo_2

2) Absorption de glucose

La disparition du glucose en fonction de la d.o. (fig 14) permet de conclure que pratiquement c'est entre une densité optique de 0,500 et 0,750 que la quantité de glucose restant dans le milieu est devenue négligeable par rapport à celle du départ.

En effet, à une d.o. de 0,600 il ne reste plus que 0,064 g de glucose/l. Ce fait expérimental est à rapprocher du maximum de production de l'acétaldéhyde qui se situe sensiblement au même moment.

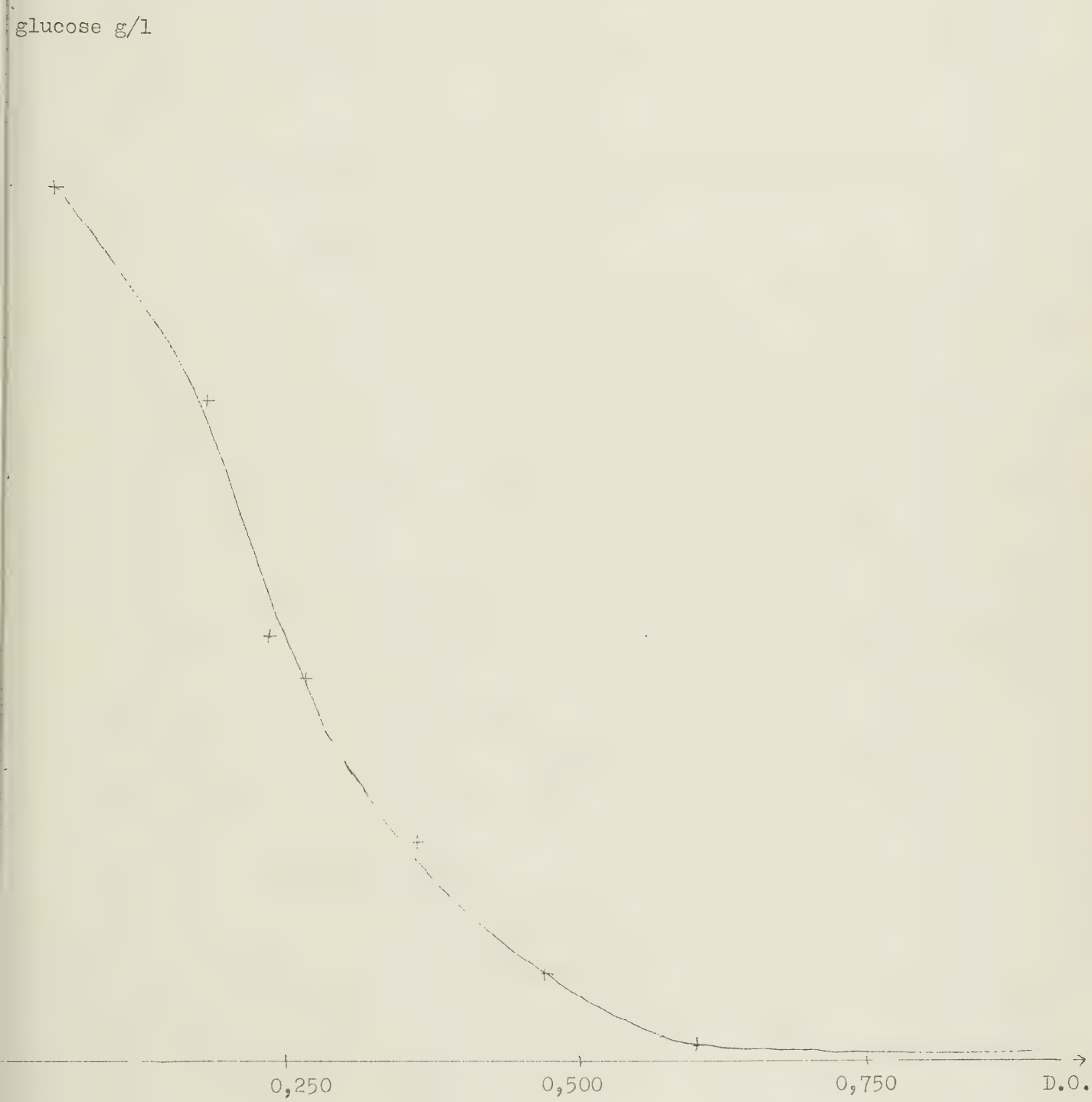


Fig 14 : Métabolisation du glucose par S. carlsbergensis dans un milieu G 4,5

Il est donc permis de faire un rapprochement entre l'accumulation de l'acétaldéhyde et l'assimilation du glucose ainsi qu'entre l'assimilation de l'acétaldéhyde et l'absence du glucose. La courbe soulignant l'évolution de l'acétaldéhyde passe par un maximum quand la teneur en glucose est presque nulle.

D) EVOLUTION DES ACTIVITES DES DIFFERENTES ALCOOLS DESHYDROGENASES

1) Conditions de travail

Les extraits de S. carlsbergensis préparés selon la double technique décrite précédemment sont testés au spectrophotomètre. Rappelons que les travaux de SCHIMPFESSEL (1968) ont mis en évidence chez S. cerevisiae deux alcools deshydrogénases liées au NAD^+. La première ou alcool deshydrogénase I est présente dans la première phase de la croissance, elle est dite fermentative, et est détruite par un traitement de 15 mn à 61°. Par contre l'alcool deshydrogénase II apparait après la diauxie, elle est dite oxydative et son activité est peu affectée par le traitement précédent. (SCHIMPFESSEL 1968).

L'appareil Perkin Elmer a du être abandonné malgré les avantages de l'enregistrement automatique. Les densités optiques obtenues s'étalent entre 0,0 et 0,500 il n'est pas possible d'utiliser avec précision cet appareil. Il possède un potentiomètre logarithmique qui lui fait perdre tous ses avantages aux faibles absorptions.

Toutes ces mesures ont donc été réalisées sur le Beckman D.U. et l'on évalue la quantité de NADH formé.

2) Résultats obtenus

a) Avec un traitement de 15 mn à 55°

Dans ce cas, et selon SCHIMPFESSEL (1964 - 1968) on mesure simultanément l'activité de l'alcool deshydrogénase I résiduelle et celle de l'alcool deshydrogénase II.

Pour la compréhension des calculs, il est apparu nécessaire de prendre un cas précis (d.o. de culture au départ soit 0,050) et de déterminer le nombre d'unités enzymatiques ainsi que l'activité spécifique d'un extrait enzymatique.

Nombre d'unités enzymatiques :

Nombre de micro-moles de NADH formées par mn dans les conditions de dosage précédemment décrites.

D.o. lors d'un traitement à 55° et par mn de réaction enzymatique : 0,133 (S. carlsbergensis à l'ensemencement)

$$U = \frac{0,133 \times 3}{6,22 \times 10^{6} \times 1} \longrightarrow \frac{3,99}{6,22} \quad 10^{-7}$$

$$\text{soit} = 6,42 \quad 10^{-7}$$

$$= 6,42 \quad 10^{-2} \quad \mu \text{ moles}$$

Activité spécifique :

Nombre d'unités enzymatiques par mg de protéines

$$a.\ s. = \frac{6,42}{1,575} \quad 10^{-2} \quad \text{soit } 4,52 \quad 10^{-2} \quad u$$

L'ensemble des résultats est condensé dans le tableau suivant :

D.O. de la culture	D.O. de l'extrait (biuret)	Protéine de l'ext. mg/ml	D.O. par mn de réact. enz.	Nb d'unités enzymatique	Activité spécifique
0,050	0,088	1,575	0,133	$6,42 \quad 10^{-2}$	$4,52 \quad 10^{-2}$
0,297	0,108	1,925	0,100	$4,82 \quad 10^{-2}$	$2,51 \quad 10^{-2}$
0,365	0,088	1,568	0,080	$3,84 \quad 10^{-2}$	$2,45 \quad 10^{-2}$
0,605	0,087	1,550	0,065	$3,14 \quad 10^{-2}$	$2,02 \quad 10^{-2}$
0,790	0,076	1,350	0,295	$14,2 \quad 10^{-2}$	$10,50 \quad 10^{-2}$

b) Avec un traitement de 15 mn à 61°

Selon SCHIMPFESSEL (1964 - 1968) et pour Saccharomyces cerevisiae l'activité mesurée ne correspond sensiblement qu'à celle de l'alcool deshydrogénase II, l'alcool deshydrogénase I étant thermolabile dans nos conditions de préparation.

On obtient les résultats suivants :

D.O. de la culture	D.O. de l'extrait (biuret)	Protéine de l'ext.mg/ml	D.O. par mn réact. enz.	Nb unités enzymatiques	Activité spécifique
0,050	0,067	1,200	0,105	$5,07\ 10^{-2}$	$4,22\ 10^{-2}$
0,297	0,117	2,090	0,100	$4,82\ 10^{-2}$	$2,31\ 10^{-2}$
0,365	0,068	1,225	0,042	$2,13\ 10^{-2}$	$1,74\ 10^{-2}$
0,605	0,084	1,500	0,052	$2,55\ 10^{-2}$	$1,64\ 10^{-2}$
0,790	0,062	1,125	0,165	$7,95\ 10^{-2}$	$6,36\ 10^{-2}$

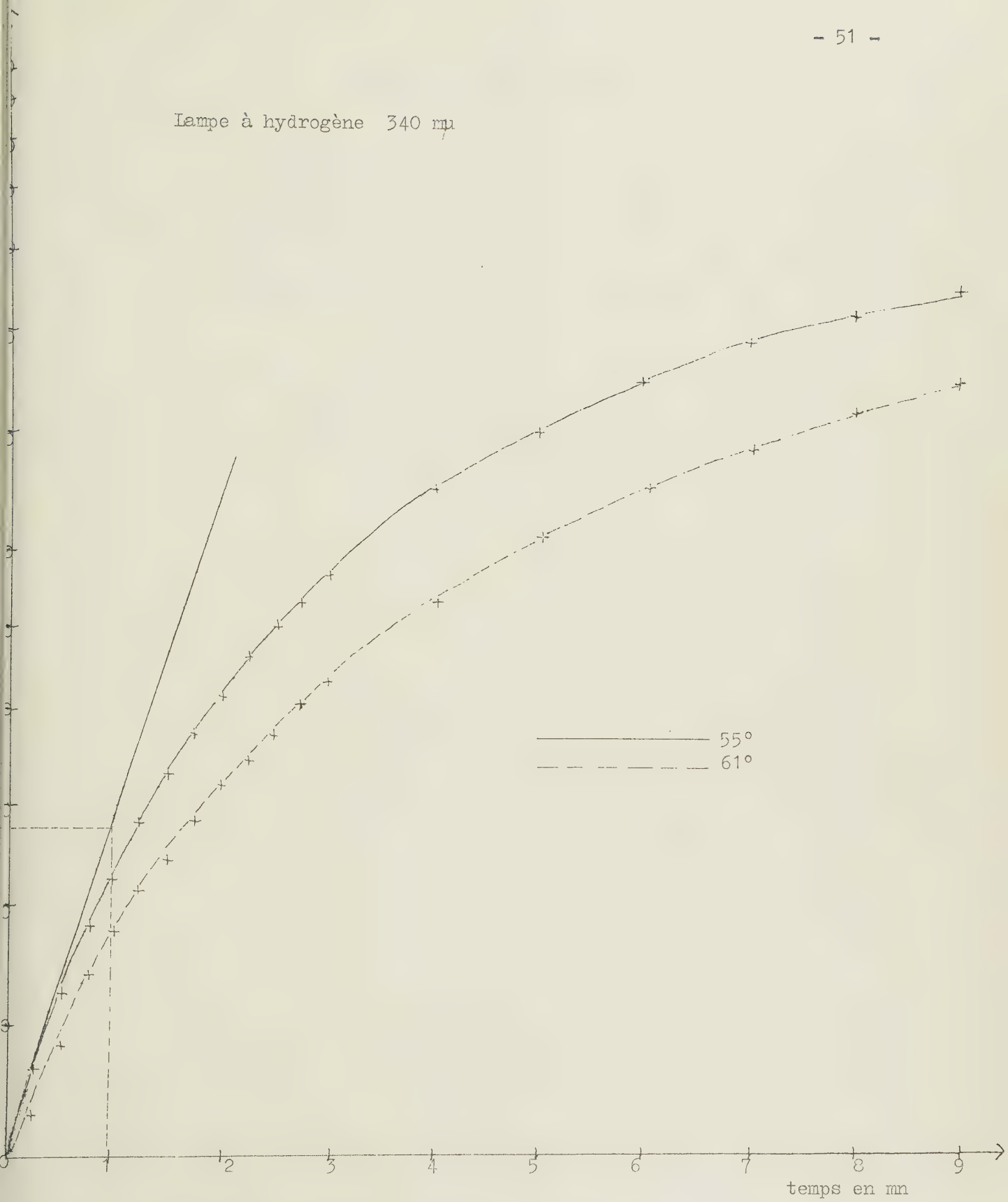


Fig 15 : Activités des ADH'ases de S. carlsbergensis à l'ensemencement (D.O. 0,050)

c) Evolution comparative des composantes I et II

D'après les résultats précédents, on peut déduire par difference l'activité résiduelle due à l'alcool deshydrogénase I dite "fermentative " (figure 16) ainsi que le pourcentage de l'alcool deshydrogénase II dite "oxydative". Ces calculs supposent que l'on peut appliquer directement les résultats obtenus avec S. cerevisiae par SCHIMPFESSEL (1964 -1968).

D.O.	Activité spécifique ADH'ase I	Activité spécifique ADH'ase II	Pourcentage ADH'ase II
0,050	0,30 10^{-2}	4,22 10^{-2}	93,5
0,297	0,20 10^{-2}	2,31 10^{-2}	92,1
0,365	0,71 10^{-2}	1,74 10^{-2}	71,0
0,605	0,38 10^{-2}	1,64 10^{-2}	81,2
0,790	4,14 10^{-2}	6,36 10^{-2}	60,6

L'ensemble de ces résultats montre une très forte augmentation d'activité en fin de croissance. Cependant c'est à l'ensemencement que l'enzyme II est en plus forte proportion (93,5 %). Ce dernier résultat obtenu avec S. carlsbergensis est différent de celui donné par SCHIMPFESSEL (1964) avec S. cerevisiae (3,3 %). Signalons également qu'à la d.o. 0,605 la composante ADH'ase II est en forte proportion (81,2 %).

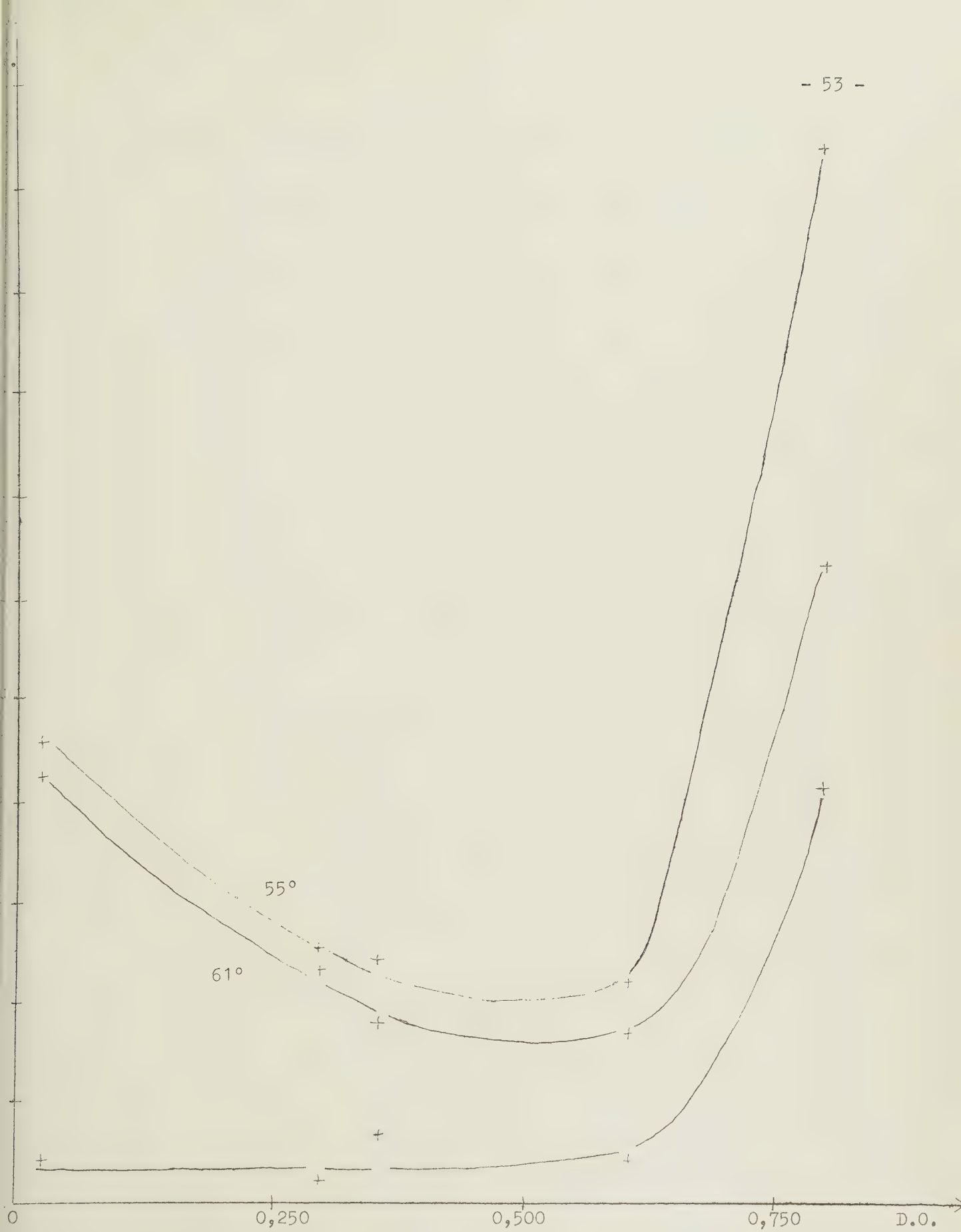


Fig 16 : Evolution de l'activité des ADH'ases

E) THERMOSTABILITES DES ALCOOLS DESHYDROGENASES DE S. CARLSBERGENSIS

1) Etude des activités obtenues pour les alcools deshydrogénases

Le dosage des alcools deshydrogénases chez S. carlsbergensis et dans nos conditions de travail ne sont pas en accord avec les résultats obtenus avec S. cerevisiae par SCHIMPFESSEL. Si l'on se base sur les travaux de cet auteur, on constate que celui-ci ne fait pas de traitement thermique à 55° pour doser les alcools deshydrogénases I et II. Dans nos essais, ce traitement à 55° a été fait afin de lever une réaction parallèle qui se produit notamment avec des levures du commerce. Dans ce cas le NADH n'est pas stable dans l'extrait brut et est immédiatement oxydé. L'étude de la cinétique d'inactivation thermique faite par SCHIMPFESSEL montre qu'il est nécessaire de faire intervenir un coefficient de correction. Les activités que nous avons mesurées à 55° et 61° nous ont incités à ne pas appliquer directement celui de SCHIMPFESSEL. En effet, à l'ensemencement (composante alcool deshydrogénase fermentative importante) la chute d'activité entre 55° et 61° est faible . Par contre en fin de croissance, lorsque S. carlsbergensis respire les composés en C_2 (composante alcool deshydrogénase oxydative importante) le même traitement provoque une chute d'activité beaucoup plus importante. Ces résultats nous permettaient déjà de penser que la thermorésistance des alcools deshydrogénases de S. carlsbergensis était différente de celle de S. cerevisiae (levure de boulangerie). Nous avons donc étudié la cinétique d'inactivation thermique dans deux cas extrêmes : fermentation du glucose (ensemencement) et respiration des C_2 (fin de croissance sur G 4,5)

2) Conditions de travail

a) Souches de levures

C'est la même que précédemment à savoir S. carlsbergensis n° 80

b) Milieux de cultures

Les précultures se font comme précédemment, c'est-à-dire milieu Yeast extract (0,5 %) glucosé (2 %) à 25° et non agitées. Les cultures se font sur milieu G 4,5 agité.

Dans les deux cas, les levures sont ensemencées dans 4 litres de milieu de façon à recueillir aprés développement au moins 5 g de levures pressées.

c) Préparation de l'extrait

Les levures récoltées sont lavées à l'eau distillée puis reprises par 15 ml de tampon phosphate 0,066 M ($PO_4H\ Na_2$). Elles sont désintégrées au moyen d'un appareil à ultrasons MSE. Le temps d'exposition est de 15 mn à 20 K cycles. L'extrait acellulaire est obtenu après 15 mn de centrifugation à 10 000 g. Après dilution convenable, il est traité à 55° pendant 5 - 10 et 15 minutes.

d) Dosage de l'activité des alcools deshydrogénases

Il se fait selon la méthode utilisée précédemment.

3) Résultats

a) Teneurs en protéines

Les teneurs en protéines sont plus importantes que dans la méthode précédente en raison de la plus forte proportion de levures traitée. Dans les dosages deux solutions ont été utilisées ; l'une est diluée deux fois, l'autre dix fois.

b) Activités des alcools deshydrogénases

Elles sont mesurées pour deux dilutions et pour des temps de traitement progressifs 5 - 10 et 15 minutes.

La figure n° 17 et le tableau n° 1 représentent ces dosages sur un extrait de levures à l'ensemencement, donc lorsque la composante fermentaire est en forte proportion.

La figure n° 18 et le tableau n° 2 représentent la même expérience mais en fin de croissance (D.O. 0,800) lorsque le Qo_2 a atteint une valeur importante. Il est possible de traduire cette évolution de façon logarithmique (figure n° 19).

Tableau n° 1

Extrait fermentaire

Concentration en protéine 1,25 mg/ml

Extrait	D.O. aprés 1'	Nb d'unités enzymatique		Activité spécifique		% d'acti. restante
brut	1,520	73,3	10^{-2}	63,2	10^{-2}	100
5'	1,276	59,9	10^{-2}	51,7	10^{-2}	81,8
10'	1,172	57,5	10^{-2}	48,7	10^{-2}	77,1
15'	1,140	54,9	10^{-2}	47,4	10^{-2}	75

Tableau n° 2

Extrait respiratoire

Concentration en protéine 5,6 mg/ml

Extrait	D.O. après 1'	Nb d'unités enzymatique		Activité spécifique		% d'acti. restante
brut	1,370	67,7	10^{-2}	12,1	10^{-2}	100
5'	0,220	10,6	10^{-2}	1,80	10^{-2}	15,7
10'	0,124	5,98	10^{-2}	1,07	10^{-2}	8,8
15'	0,080	3,88	10^{-2}	1,02	10^{-2}	5,7

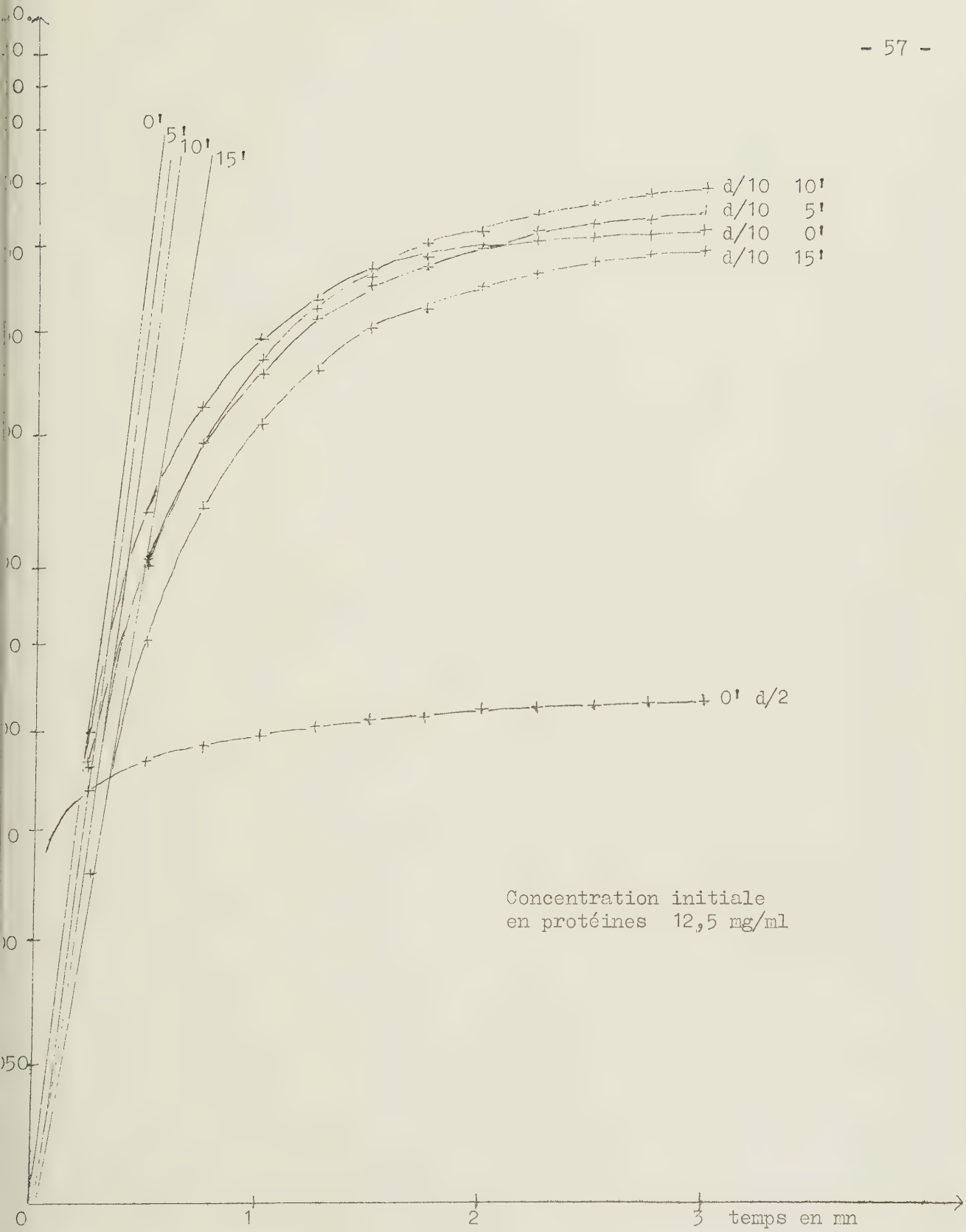


Fig 17 : Activités des ADH'ases fermentaires après 0 - 5 - 10 et 15 mn à 55°

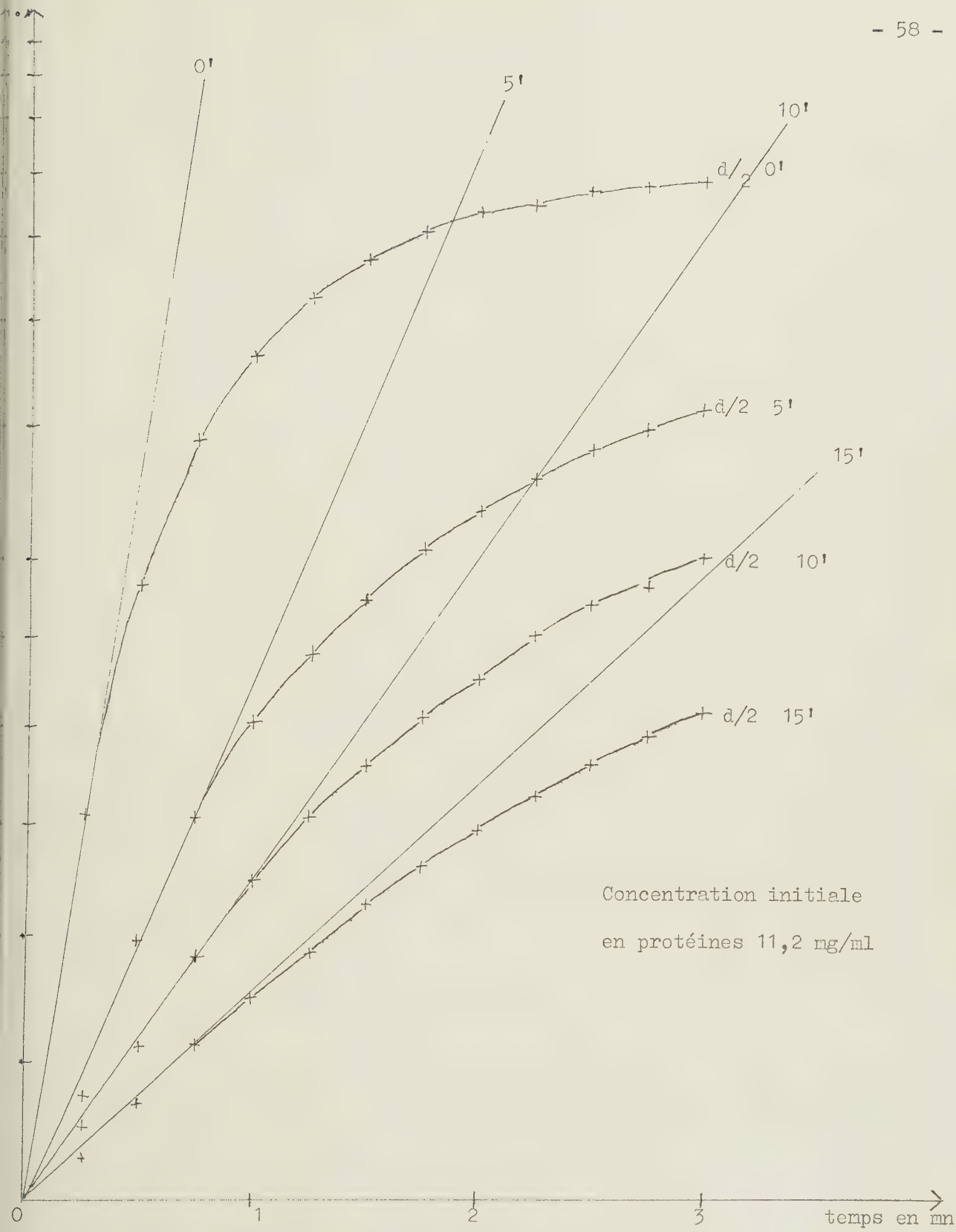


Fig 18 : Activité des ADH'ases respiratoires après 0 - 5 - 10 - 15 mn à 55°

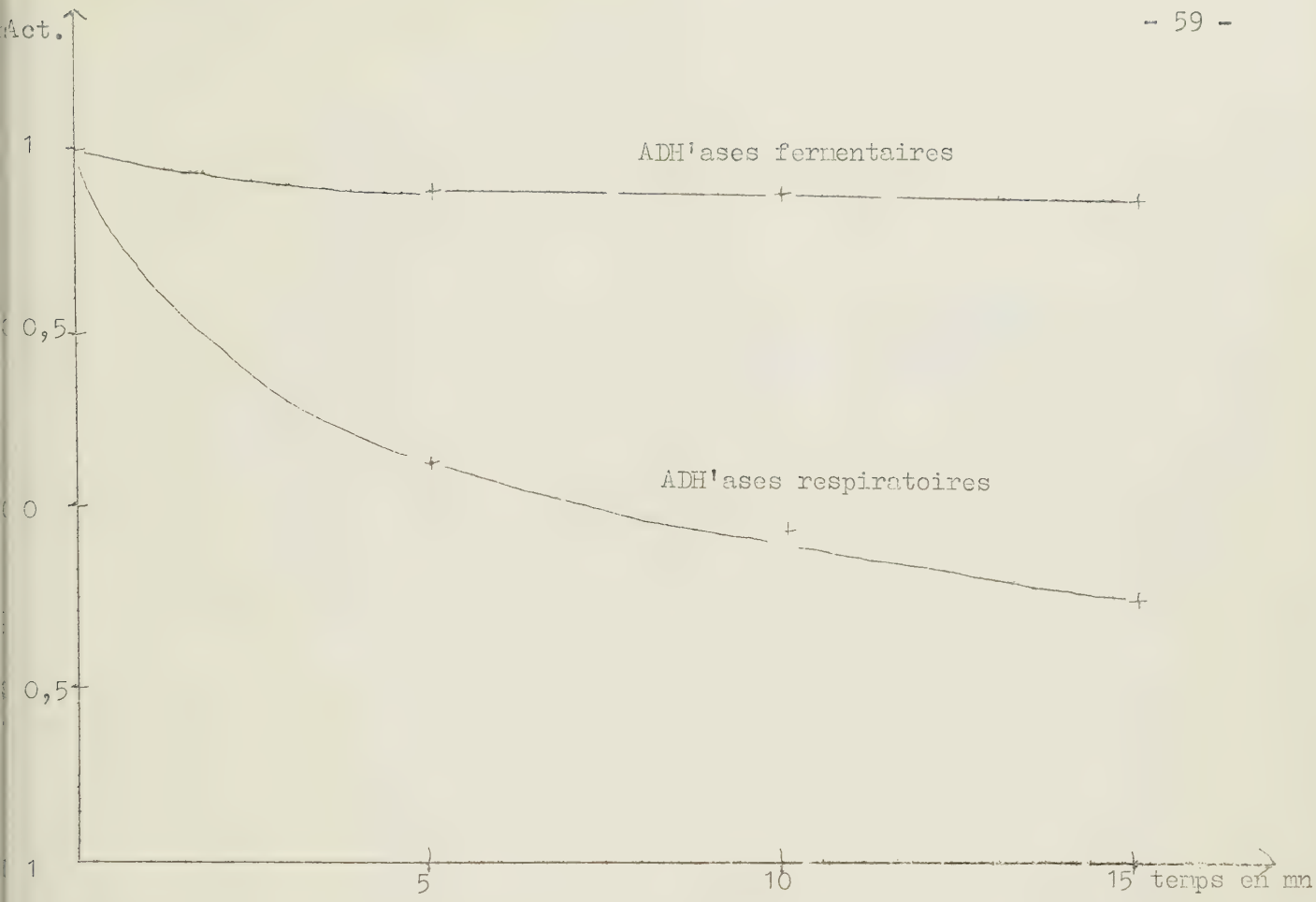


Fig 19 : Evolution des activités des ADH'ases par un traitement thermique à 55°

Dans le cas de l'alcool deshydrogénase fermentaire les dosages faits en diluant l'extrait deux fois mettent en évidence une limitation de la réaction éthanol-acétaldéhyde. A cette dilution et pour l'enzyme respiratoire on obtient également une bonne activité, mais à la dilution 10 l'enzyme est entièrement détruite par 5 mn à 55°.

4) Discussion des résultats

Les derniers résultats obtenus confirment bien les premiers travaux qui supposaient une plus forte sensibilité de l'alcool deshydrogénase oxydative lors du traitement thermique. A l'ensemencement l'activité spécifique totale qui était de 4,52 10^{-2} doit donc être majorée de 25 % et en fin de culture l'activité de 10,5 10^{-2} ne représente sensiblement que 6 % de la valeur réelle.

SCHIMPFESSEL a montré l'inverse sur S. cerevisiae, c'est-à-dire que l'alcool deshydrogénase respiratoire est pratiquement insensible à 55°.

Ces deux résultats ne sont cependant pas incompatibles. En effet LUTSTORF et MEGNET (septembre 1968) viennent de mettre en évidence chez S. cerevisiae un équipement enzymatique multiple en alcools deshydrogénases. Notamment il existe des ADH'ase I,II,III et IV que l'on peut séparer par électrophorèse sur gel. L'ADH'ase IV est particulièrement sensible à la température et ces auteurs testant une levure de brasserie ont mis en évidence que cet enzyme est proportionnellement le plus important après 48 heures de croissance dans un milieu glucose - yeast extract.

DISCUSSION GENERALE

L'utilisation préférentielle par les microorganismes de certains substrats comme le glucose est connue depuis longtemps.

L'effet glucose se traduit par l'inhibition de la synthèse d'un certain nombre d'enzymes par le glucose. La généralisation de ces considérations a conduit MAGASANIK a émettre l'hypothèse de la répression catabolique.

Ainsi la fermentation aérobie du glucose mise en évidence par SWANSON et CLIFTON et précisée par LEMOIGNE implique la repression de certains enzymes du cycle tricarboxylique parmi lesquels il convient de signaler :

- l'isocitrate lyase-Kornberg (1958)
- la malate synthase-Kornberg (1958)
- l'isocitrate deshydrogénase-Mac Quillan et Halvorson (1962)
- la succinique deshydrogénase-Mac Quillan et Halvorson (1962)
- la cytochrome c oxydase - Polakis et al. (1964)
- NADH cytochrome c oxydoreductase - Polakis et al. (1964)
- NADH oxydase - Polakis et al. (1964)
- alcool deshydrogénase - Witt et al. (1965)
- malate deshydrogénase - Witt et al. (1965)

Il en résulte des variations complémentaires de la capacité respiratoire et fermentaire au cours de la croissance aérobie sur glucose.

La diminution de la capacité respiratoire qui caractérise le début de la phase exponentielle de croissance s'explique de ce fait par une réduction de la concentration de certains enzymes respiratoires.

Un contre effet PASTEUR n'affecte donc pas le fonctionnement (effet PASTEUR), mais bien la formation des enzymes respiratoires.

Cette inhibition par le glucose constitue la base même du phénomène de la diauxie.

L'épuisement du milieu en sucre provoque un ralentissement puis un arrêt de la croissance. L'éthanol accumulé n'est ensuite utilisé qu'après une période d'adaptation nécessaire à la réorganisation de la cellule. Cette réorganisation implique des modifications importantes au niveau des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques (C.T.C.) et du shunt glyoxylique.

La fermentation aérobie du glucose conduit à la formation de pyruvate qui, après oxydation en Acétyl-CoA et condensation avec l'oxaloacétate, pénètre dans le C.T.C. L'absence des enzymes du shunt glyoxylique (isocitrate lyase et malate synthase), ainsi que l'activité réduite de la deshydrogénase succinique, ne permettent plus qu'un fonctionnement partiel du C.T.C. ; son rôle serait dès lors plutôt biosynthétique qu'énergétique, chaque métabolite servant d'intermédiaire pour la synthèse des constituants cellulaires.

Par contre, après croissance sur acétate, le cycle est complet et se présente alors sous son double aspect : énergétique et biosynthétique.

En effet, la présence des enzymes du shunt augmente sensiblement le taux en substrats directement oxydables et renforce ainsi le caractère oxydatif et donc énergétique du cycle par l'accroissement du taux d'activité de la deshydrogénase succinique.

Un phénomène semblable, mais particulièrement marqué a été mis en évidence chez Saccharomyces carlsbergensis (MASSCHELEIN et al. 1960)

Cette levure présente dans des conditions où la croissance est limitée par la concentration en glucose, un phénomène de diauxie dont la durée dépend essentiellement de la capacité respiratoire de l'inoculum.

Dans ces mêmes conditions l'analyse physiologique comparée de S. cerevisiae se caractérise par un simple fléchissement de la courbe en fin de croissance. S. carlsbergensis respire faiblement le glucose, l'éthanol et l'acétate sans adaptation préalable.

Nous savons que la réaction de décarboxylation du pyruvate occupe une position particulièrement centrale dans le métabolisme général de la levure. Cette même réaction peut en effet en s'intégrant au cours de la diauxie à un métabolisme oxydatif fournir l'acétyl-S-CoA, métabolite carrefour entre l'anabolisme et le catabolisme.

L'acétaldéhyde formé au cours de la première phase de croissance par fonctionnement préférentiel de la carboxylase est essentiellement transformé en éthanol par l'alcool deshydrogénase fermentative.

Cette transformation assure par ailleurs la réoxydation du NADH nécessaire au fonctionnement de la glycéraldéhyde deshydrogénase. Le couplage de ces deux réactions assure alors un régime d'équilibre qui ne sera modifié que par l'accumulation de la forme oxydée ou réduite de ce coenzyme.

SCHIMPFESSEL a montré que S. cerevisiae peut synthétiser deux alcools deshydrogénases suivant la nature du substrat carboné : une ADH'ase I produite en croissance aérobie en anaérobie sur glucose et une ADH'ase II produite par la levure en croissance sur un substrat respiratoire tel que l'éthanol ou l'acétate.

C'est la régulation de la synthèse de ces deux enzymes au cours de la croissance aérobie sur glucose de S. carlsbergensis qui a fait l'objet du présent travail.

La détermination chromatographique de l'acétaldéhyde chez S. carlsbergensis et sa évolution dans les conditions particulières suivantes :

- précultures non agitées sur Yeast Extract (0,5 %) glucosé à 2 % en semi-anaérobiose,
- cultures agitées, aérobiose limitée sur milieux à 1,5 et 4,5 g de glucose par litre (G 1,5 et G 4,5)

nous ont amené à étudier son métabolisme. Les courbes de croissance nous ont permis de confirmer les travaux de MASSCHELEIN et coll. Nos conditions expérimentales sont différentes et cela nous a permis de mettre en évidence un rôle très important de glucose sur le métabolisme de l'acétaldéhyde. La différence d'accumulation que l'on constate avec les deux milieux G 4,5 et G 1,5 est disproportionnée par rapport à la simple réduction de la teneur en glucose. Si celle-ci est divisée par trois, la quantité d'acétaldéhyde est abaissée au dizième de la valeur de départ. D'autre part, on constate que l'acétaldéhyde est métabolisé plus avant dès que le glucose du milieu est épuisé, ce qui rappelle le phénomène de diauxie. Notons qu'en aérobiose il y a parallèlisme entre l'accumulation de l'acétaldéhyde et l'éthanol, ainsi qu'entre la réutilisation de ces deux métabolites. Par contre en anaérobiose l'éthanol s'accumule sans être repris alors que l'acétaldéhyde ne s'accumule plus. Ces données laissent donc supposer qu'en aérobiose les enzymes qui interviennent dans le métabolisme de ce composé en C_2 sont sensibles à la répression catabolique. Nos résultats expérimentaux, accumulation d'acétaldéhyde et persistance du glucose, semblent montrer que les aldéhydes deshydrogénases sont également sensibles à cette répression.

Il reste cependant à préciser le rôle joué par chacune des deux aldéhydes deshydrogénases (liées au NAD^+ et au $NADP^+$) responsables du passage acétaldéhyde-acétate.

En anaérobiose, on ne constate pas ce phénomène d'accumulation. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'une ADH'ase I disposant d'un "pool" NADH suffisant alors que les voies oxydatives sont inexistantes (SCHIMPFESSEL 1964). Le coenzyme ainsi oxydé serait réduit à nouveau par des voies cataboliques. Cependant on ne peut trouver dans un manque de NADH et lors de l'aérobiose l'explication de la diminution très importante dans la production de l'acétaldéhyde lorsque l'on passe de G 4,5 à G 1,5. La répression catabolique semble donc bien exister. Signalons également que la cinétique enzymatique est très en faveur de la formation de l'éthanol au dépend de l'oxydation en acétate (NORDSTROM 1966-1968) et que les vitesses de réactions ne semblent pas intervenir dans cette régulation.

Dans le présent travail nous nous sommes appuyés sur les travaux de SCHIMPFESSEL et avons essayé d'appliquer sa méthode expérimentale à l'espèce carlsbergensis sans toutefois refaire tous les essais de caractérisation. En conséquence nous n'avons pas étudié :

1) Les spécificités, les pH optima et la localisation des différentes alcools deshydrogénases

2) La purification des alcools deshydrogénases ainsi que l'étude de leur propriétés physico-chimiques (constantes de MICHAELIS)

Nous n'avons pas déterminé :

1) L'importance relative des voies d'assimilation du glucose par dosage de l'activité des aldolase (E.M.P.) et glucose 6 phosphate deshydrogénase (W.D.)

2) Egalement la répartition des enzymes au niveau du cycle de KREBS : isocitrate deshydrogénase, succinate deshydrogénase, fumarase, malique deshydrogénase.

Cependant l'étude des alcools deshydrogénases chez S. carlsbergensis ne sont pas semblables aux résultats obtenus avec S. cerevisiae par SCHIMPFESSEL. En particulier, pour l'alcool deshydrogénase respiratoire la sensibilité au traitement thermique (15 mn à 55°) est très importante alors que pour S. cerevisiae la stabilité est remarquable. Par contre pour l'alcool deshydrogénase fermentative on obtient une thermosensibilité voisine de celle de l'auteur cité. Nous obtenons également une augmentation de l'activité totale des ADH'ases à partir d'une d.o. de 0,600 ce qui coïncide sensiblement avec :

1) un maximum d'accumulation d'acétaldéhyde
2) une teneur en glucose dans le milieu fermentaire pratiquement nulle
3) un Qo_2 trés proche de sa valeur maximale.

Le fait d'utiliser à priori les résultats obtenus par SCHIMPFESSEL et de les appliquer à S. carlsbergensis nous a conduit à écrire que la composante II des alcools deshydrogénases était en forte proportion à l'ensemencement. Ceci est incompatible avec le mode de préculture semi-anaérobie confirmé par le Qo_2 initial de 18. Il correspond à un Qo_2 endogène normal. En réalité le choc thermique que nous avons effectué pendant 15 mn à 15° et l'étude des thermosensibilités nous ont permis de mettre en évidence que l'alcool deshydrogénase respiratoire de la levure de brasserie S. carlsbergensis, souche n° 80, avait une thermostabilité inverse de celle de S. cerevisiae. Ceci explique les résultats paradoxaux obtenus en appliquant les données relevés chez S. cerevisiae. Notre étude reçoit maintenant une confirmation partielle avec les travaux de LUTSTORF et MEGNET (septembre 1968). Ces auteurs confirment bien que pour une levure de brasserie, ils obtiennent parmi de nombreuses alcools deshydrogénases, une composante IV apparaissant en fin de culture sur milieu "yeast extract" glucosé et spécifique de la souche testée.

Cette alcool deshydrogénase IV est absente pour une souche de S. carlsbergensis, et chez les levures de boulangerie. Par contre, elle est présente en fin de culture pour S. fragilis. Elle est également présente pour une souche haploïde de S. cerevisiae où elle a été testée montrant une très forte sensibilité au traitement thermique.

Pour être complet signalons également que ces auteurs ainsi que SCHIMPFESSEL (communication personnelle) et WIEME ont mis en évidence un équipement multiple en alcool deshydrogénases. A la lumière de nos résultats il serait particulièrement intéressant de suivre chez les levures de brasserie l'évolution de ces enzymes et leur régulation. Lors de la diauxie leurs différents rôles physiologiques restent à déterminer. D'ore et déjà on peut supposer qu'à ce niveau se produit une réorganisation importante dans ce complexe enzymatique. L'étude des NAD^+ et $NADP^+$ aldéhydes deshydrogénases couplée à celle des alcools deshydrogénases apportera sans aucun doute l'explication complète du phénomène d'accumulation d'acétaldéhyde observé chez S. carlsbergensis.

- R E S U M E -

L'étude de la production d'acétaldéhyde chez Saccharomyces carlsbergensis (levure de brasserie) a montré que sur milieu glucosé (4,5 g/l), source de carbone limitante, il y a une forte accumulation puis une reprise de ce métabolite lorsque la culture est faite en aérobiose limitée. Ce double phénomène est inexistant en anaérobiose. On a mis en évidence que le maximum de production correspond à une teneur en glucose dans le milieu fermentaire pratiquement nulle, à un Qo_2 proche de sa valeur maximale et à une activité totale alcool deshydrogénase minimum.

Des résultats paradoxaux étant obtenus pour les alcools deshydrogénases lors de l'ensemencement et en fin de culture on a étudié leurs propriétés. Contrairement à S. cerevisiae (SCHIMPFESSEL 1964) les alcools deshydrogénases respiratoires de S. carlsbergensis sont beaucoup plus sensibles à un traitement thermique de 55° que les alcools deshydrogénases fermentaires. Les conséquences de cette thermosensibilité sont ensuite commentées.

B I B L I O G R A P H I E

- BLACK S., (1951) - Arch. Biochem. Biophys. 34,86
- BOURGEOIS C. - E.S.B.M.B.A. Nancy (Communication personnelle)
- BRADLEY, STINE, (1962) - Jl Dairy Sciences 45,10, 1259
- CHUANG L.F., COLLINS E.B. (1968) - J. Bact, 6, 2083
- DENSHCHIKOV M.T., RYLKIN S.S., ZHVIRBLYANSKAYA A.Y. (1963) - Chem. Abst. 58, 9, 9599 C.
- EBISUZAKI K., BARRON E.S.G. (1957) - Arch. Biochem. Biophys. 69,555
- ENEBO L., (1957) - Proc. Eur. Brew. Conv, 370
- EPHRUSSI B., SLONIMSKY P.P., YOTSUYANAGI Y., TAVLIZKI J.C.R. (1956) - Trav. Lab. Carsberg, Série Phys., 26,87
- EHRLICH F. (1907) - Ber. Dt. Chem. Ges., 40,1027
- GAY R., (1964) - Bulletin E.B.N., 98
- GAY R., (1968) - Biotechnique 1969 (sous presse) - Conférence Anciens Elèves de l'Ecole de Brasserie, 10 novembre 1968
- GENEVOIS L., BARAUD J., (1959) - Indust. Alim. Agr., 837
- GORNALL A.G., BARDAWILL C.J., DAVID M.M. (1959) - J. Biol. Chem., 177,751
- GALZY P., BIZEAU C., VEZINHET F., (1967) - Am. Nutri. Aliment. 21,3, B 41
- HABOUCHA J., MASSCHELEIN CH. A., DEVREUX A., (1959) - Proc. Eur. Brew. Conv. 157
- HABOUCHA J., MASSCHELEIN CH.A., (1960) Biochem. Biophys. Acta, 38, 1
- HOFFMAN W.S., (1937) - J. Biol. Chem. 120, 51
- JOHNSON M.J. (1941) - Science, 94, 200
- KEPNER, STRATING, WEURMAN, (1963) - Jl Inst. Brew.,399

- KORNBERG H.L. (1958) Proc. IV Inter. Congress of Biochem. Vienne, 251
- KORNER A., PRICER W.E., (1951) - J. Biol. Chem., 189, 123
- KRAMPITZ L.O., SAZ H.J., (1955) - J. Bact., 69, 288
- LIPMANN, (1942) - Symposium on Respiratory Enzymes, 48
- LODDER J, KREGER-VAN-REJ N.J.W., (1952) - The Yeasts, a taxonomic study North Holland Publishing Co
- LYNEN F., (1941) - Ann., 546, 120
- LUTSTORF U., MEGNET R. (1968) - Archiv. Biochem. Biophys. 126, 933
- MAC QUILLAN A.M., HALVORSON H.O., (1962) J. Bact, 84, 31
- MASSCHELEIN C.A. - C.E.R.I.A. Bruxelles (Communication personnelle)
- MOORE S., STEIN W.H. (1948) - J. Biol. Chem. 176, 367
- NEUBAUER O., FROMHERZ K., (1911) - Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 207,275
- NORDSTROM K. (1966) - Acta Chem. Scand, 20,2,474
- NORDSTROM K. (1968) Jl. Inst. Brew., 74, 192
- OCHOA S. (1958) - Adv. Enz. 15,185
- PASTEUR L. (1876) - Etudes sur la bière - Gautier Villars, Paris
- POLAKIS E.S., BARTLEY W., MEEK G.A. (1964), Biochem. J., 90, 369
- RACKER E. (1950) - J. Biol. Chem., 184, 313
- RACKER E. (1955) - Methods in Enzymology, 1, 500
- RIBEREAU-GAYON J., PAYNAUD E., (1953) - Compt Rend. Acad. Sciences, 670
- RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., LAFON M., (1955) - Bull. Ste Chim. Biol. 37, 4, 457
- SANDEGREN E., ENEBO L. (1961) - Wall. Labo. Comm., 14,85, 269
- SCHIMPFESSEL L., (1964) - Aspect de la régulation des alcools deshydrogénases Th. Dct. Sciences - Fac. de Médecine et de Pharmacie - Bruxelles

- SCHIMPFESSEL L. (1968) - Biochm. Biophys. Acta, 151, 317
- SCHIMPFESSEL L. - Fac. de Médecine et de Pharmacie, Bruxelles (communication personnelle)
- SEEGMILLER J.E., (1953) - J. Biol. Chem. 201, 629
- SENTHE SHANMU GENETHAN S., ELSDEN S.R., (1958) - Biochem. J., 69, 210
- SLONIMSKY (1956) - Proceeding 3ème Cong. Int. Biochimie, Bruxelles, 242
- SOLS A., (1968) - Aspects of yeast Metabolim par Mills et Krebs Ed. Blackwell , 47
- SWANSON W.B., CLIFTON C.E., (1948) - J. Bact 56, 115
- UMBREIT, BURRIS, STAUFFER, (1964) - Manometric Techniques Ed Burgers Publishing Co.
- VANDERWINKEL E., BOURGEOIS S., WIAME J.M., (1958) - Arch. Intern. Physiol. Biochm. 66, 129
- VAN EYS J., (1961) - Regulatory Mechanism in Energy Metabolism in D.M. Bonner : Control mechanism in cellular processus, 141
- VAN SLYKE D.D., DILLON R.T., MAC FAYDYEN D.A., HAMILTON P.B. - J. Biol. Chem. (1941), 141, 627, 671, (1943) 150, 251
- WIAME J.M., STORCK R., (1953) Biochem. Biophys. Acta, 10,268
- WICKERHAM L.J., BURTON K.A. (1948) - J. Bact. 56; 363
- WIKEN T.O., RICHARD O. (1953) - Experientia, 9, 417
- WIKEN T.O. (1968) - Aspects of Yeast Metabolim par Mills et Krebs Ed Blackwell, 133
- WITT I., KRONAN R., HOLZER H. (1968) Aspects of Yeast Metabolism par Mills et Krebs Ed Blackwell, 173

TABLE DES MATIERES

pages

BUT DU PRESENT TRAVAIL 1

PARTIE THEORIQUE 2

A) Voies métaboliques de dégradation des hexoses 2

B) Régulation des voies d'assimilation des hexoses 7

C) Voies métaboliques de dégradation des composés en C_2 et leur régulation 12

D) Rapports avec la synthèse des alcools supérieurs 13

MATERIELS ET TECHNIQUES UTILISES 17

A) Cultures 17

1) Souches de levures
2) Milieux de cultures
3) Techniques de cultures

B) Etablissement des courbes de croissance 19

C) Détermination des substances volatiles par chromatographie en phase gazeuse 22

1) Matériel
2) Conditions de travail
3) Mesures quantitatives et courbe d'étalonnage

D) Détermination du QO_2 26

E) Dosage du glucose dans le milieu fermentaire 26

F) Dosage de l'azote dans le milieu fermentaire 27

G) Dosage de l'activité des alcools deshydrogénases 29

1) Préparation de l'extrait
2) Dosage des protéines
3) Mesure de l'activité au spectrophotomètre

RESULTATS EXPERIMENTAUX 33

A) Courbes de croissance des différentes levures 33

1) Agitation douce - Aération limitée
2) Agitation forte - Aération libre

B) Production d'acétaldéhyde 40

1) S. carlsbergensis
2) S. cerevisiae

C) Evolution du QO_2 et absorption du glucose 45

1) Evolution du QO_2
2) Absorption du glucose

C) Evolution des activités des différentes alcools deshydrogénases 48

1) Conditions de travail
2) Résultats obtenus

E) Thermostabilités des alcools deshydrogénases de S. carlsbergensis 54

1) Etude des activités obtenus pour les alcools deshydrogénases
2) Conditions de travail
3) Résultats
4) Discussions des résultats

DISCUSSION GENERALE 61

A B R E V I A T I O N S

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

Acétyl-CoA	CH_3 - CO - S - Coenzyme A.
A D H' ase I	Alcool deshydrogénase I, fermentative
A D H' ase II	Alcool deshydrogénase II, oxydative
A D P	Adénosine di phosphate
A M P	Adénosine mono phosphate
A T P	Adénosine tri phosphate
CoA-SH	Coenzyme A
C.T.C.	Cycle tricarboxylique
D - L C R	D - lactico cytochrome c réductase
D. O.	Densité optique
E. M. P.	Voie EMBDEN - MEYERHOF - PARNAS
F A D - F A D H_2	Flavine adenine dinucléotide forme oxydée et réduite
F D P	Fructose 1 - 6 diphosphate

F 6 P	Fructose 6 phosphate
G 1,5	Milieu de culture complet à 1,5 g de glucose/l
G 4,5	Milieu de culture complet à 4,5 g de glucose/l
G 6 P	Glucose 6 phosphate
G T P - G D P	Guanosine diphosphate - guanosine triphosphate
L I P	Acide lipoïque
L - L C R	L - lactico cytochrome c réductase
N A D^+ - N A D H + H^+	Nicotinamide-adénine-dinucléotide forme oxydée et réduite
N A D H - C R	Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit cytochrome c réductase
N A D P^+ - N A D P H + H^+	Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate forme oxydée et réduite
N A D P H - C R	Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit cytochrome c réductase
Pi	Phosphate inorganique
Qo_2	Nombre de µl d'oxygène absorbés pendant une heure par mg de poids sec de levure dans l'air
S - C R	Succino cytochrome c réductase
T. P. P.	Thiamine pyrophosphate
W. D.	Voie de WARBURG - DICKENS ou cycle des pentoses phosphates

DEUXIEME THESE

proposition donnée par la Faculté

LES EFFETS PASTEUR NEGATIFS CHEZ

LES LEVURES

Vu, approuvé

et permis d'imprimer

Nancy, le 4 décembre 1968

Le DOYEN

J. AUBRY